UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ALLAN CARVALHO MENDES

***O*-Glicosilação com N-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) e eventos que contribuem para a
formação da placa aterosclerótica**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

ALLAN CARVALHO MENDES

***O*-Glicosilação com N-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) e eventos que contribuem para a formação da placa aterosclerótica**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Departamento Técnico do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP
Universidade de São Paulo
Ficha Catalográfica

Mendes, Allan Carvalho

O-Glicosilação com N-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) e eventos que contribuem para a formação da placa aterosclerótica, 2020. 166 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo – Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Tostes, Rita de Cássia

1. Aterosclerose. 2. *O*-Glicosilação com N-acetil-glucosamina. 3. Lisofosfatidilcolina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Allan Carvalho Mendes

Título: *O-Glicosilação com N-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) e eventos que contribuem para a formação da placa aterosclerótica*

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Presidente:	Assinatura:	_____
	Prof(a). Dr(a).	_____
	Instituição:	_____

Examinador:	Assinatura:	_____
	Prof(a). Dr(a).	_____
	Instituição:	_____

Examinador:	Assinatura:	_____
	Prof(a). Dr(a).	_____
	Instituição:	_____

Dedicatória

Aos meus pais, David e Célia,
que não pouparam esforços por mim.

Por terem me fornecido amor, cuidados, ensinamentos e oportunidades que foram
fundamentais para minhas conquistas e evolução.

A eles, que são meus alicerces de ética e moral, não só dedico, mas também agradeço... ♥

Agradecimentos

À Deus pelo dom da vida e pelas intervenções positivas que me permitiram alcançar esse patamar na minha formação acadêmica.

Aos meus familiares que puderam contribuir positivamente mesmo à distância e que sempre me incitaram a buscar pelo sucesso na minha vida pessoal e profissional, apoiando também minhas escolhas e decisões corretas. O meu mais sincero obrigado para minhas avós e meus tios, tias, padrinhos, madrinhas, primos e primas das famílias Carvalho e Mendes.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rita Tostes por me acolher em seu laboratório e oferecer essa oportunidade. Tenho gratidão pelos ensinamentos, orientação, carinho, incentivo, confiança, paciência e exemplo de amor à ciência.

Ao Prof. Dr. Fernando Carneiro, que como colaborador fixo forneceu seu laboratório para a condução de alguns experimentos. Agradeço também pelas discussões científicas, filosóficas e divertidas que compartilhamos.

Aos amigos e colegas que já passaram pelo laboratório ou ainda fazem parte da equipe: Alecsander Bressan, Aline Fedoce, Beatriz Carneiro, Bruno Petroski, Camila Pereira, Camila Zanotto, Carla Pavan, Daniel Rodrigues, Débora Akemi, Diane Rassi, Emiliana Abrão, Fabíola Mestriner, Fernanda Rodrigues, Fernanda Minelli, Giuliana Bertozi, Jeimison Santos, Josiane Silva, Juliana Bolsoni, Juliano Vilela, Júlio Neto, Nathanne Ferreira, Pedro Barreto, Rafael Fais, Rafael Menezes, Rafael Paschoalato, Sara Hott, Teles Neto, Thiago Dias e Tiago Januário. Obrigado pelo convívio, companhia para refeições e cafés, conversas, contribuições científicas teóricas e práticas, ideias, dicas, auxílio nos experimentos e apoio pessoal e profissional.

Aos pós-graduandos e pós-doutorandos do Departamento de Farmacologia com quem fiz amizade, por serem companheiros nessa luta e pelas dicas e aconselhamentos.

Aos professores de outros laboratórios pela disponibilidade oferecida para o uso de certos equipamentos e aos que ficaram responsáveis por fiscalizar, pelo tempo consumido para me ajudar na utilização.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, em especial ao José Waldik Ramon, Gislaine, Eleni e Tadeu (*in memoriam*) pelo carinho e atenção.

Aos funcionários do biotério Orlando, Eliana e Marcos pelos serviços prestados.

Às minhas amigas de Ribeirão Preto-SP que fiz fora do laboratório e que passaram pela minha vida durante a trajetória do meu mestrado contribuindo com experiências, conhecimento e momentos de descontração.

Ao meu ex-professor Dr. Disney Oliver Sivieri-Jr. por ter sido meu orientador na graduação e que foi responsável por transmitir muito do que sei hoje sobre Farmacologia. Esses aprendizados foram um incentivo para que eu escolhesse essa área de atuação.

Aos demais professores da minha graduação que tive na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) cujas informações fornecidas durante o curso me auxiliaram no aprendizado de certos conteúdos essenciais cuja compreensão seria indispensável para a condução desse presente estudo.

Aos amigos de vida que tenho em Guanhães-MG, em especial aos membros do *Grupo da Mesa e Confraria*. Sou grato também aos companheiros que fiz em Diamantina-MG na época da graduação e mantenho até hoje, com destaque para meus queridos Cleriston, Thiago, Hudson e Pedro que comigo formamos o mais “fantástico” *Quinteto*. Essas amigas sempre me fizeram lembrar e acreditar que lograr esse objetivo era possível.

Ao meu amigo Vinícius Detoni que acreditou no meu potencial e me encorajou a fazer inscrição para participar do Curso de Inverno de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em 2016 e que futuramente iria me empolgar para prestar a avaliação de seleção que desencadeou na minha entrada no mesmo programa de pós-graduação, em 2017.

Aos psiquiatras Gabriel Elias (Ribeirão Preto-SP) e Alex Lage (Guanhães-MG) e às psicólogas Brisa Burgos e Patrícia Nardi pelo acompanhamento e ajuda profissional fornecida nessa fase.

Aos membros da banca examinadora que se disponibilizaram para avaliar meu trabalho e fazer críticas e sugestões construtivas a fim de enriquecê-lo.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Departamento de Farmacologia por me concederem toda estrutura para realizar esse trabalho.

Ao Centro de Pesquisas em Doenças Inflamatórias (CRID), às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

Em suma, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de uma forma ou outra me motivaram ou auxiliaram para que eu conseguisse alcançar essa etapa crucial da minha formação acadêmica.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.” (Albert Einstein)

Resumo

MENDES, AC. ***O-Glicosilação com N-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) e eventos que contribuem para a formação da placa aterosclerótica.*** 2020. 166 p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A aterosclerose é uma condição patológica crônica e inflamatória que afeta artérias de grande e médio calibre e representa um risco para desfechos clínicos como infarto do miocárdio (IM) e acidente vascular encefálico (AVE). A modificação de proteínas por *O*-glicosilação com N-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) afeta a função vascular, processos inflamatórios e estresse oxidativo, eventos que também estão alterados na aterosclerose. Logo, essa modificação pós-traducional de proteínas pode ter papel no desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Foram usados camundongos machos C57BL/6J selvagens (WT) e deficientes para apolipoproteína E (ApoE^{-/-}). Os camundongos ApoE^{-/-} exibiram perfil dislipidêmico, formação de placas no arco aórtico e intenso estresse oxidativo local. Além disso, o nível de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc estava aumentado em regiões de placa. Os camundongos ApoE^{-/-} apresentaram aumento na concentração de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na gordura epididimal e altas concentrações séricas de nitrito, parâmetros que foram inibidos por Thiamet G, droga que aumenta a taxa de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. Camundongos ApoE^{-/-} apresentaram disfunção endotelial e lisofosfatidilcolina (LPC), um lipídio aterogênico, diminuiu a resposta vasodilatadora dependente de endotélio. No entanto, Thiamet G não afetou esses parâmetros de função vascular. Em células endoteliais, LPC reduziu a produção basal de óxido nítrico (NO) e aumentou a geração de espécies reativas do oxigênio (EROs). Nessas células, LPC também aumentou o nível de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, em resposta a Thiamet G, e diminuiu a fosforilação do resíduo de ativação (Serina 1177) da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A redução de TNF- α e da dosagem sérica de nitrito promovida por Thiamet G sugere que a modificação por *O*-GlcNAc tem efeitos anti-inflamatórios. Mais estudos são necessários para avaliar os efeitos da modificação por *O*-GlcNAc em outros eventos da doença, como estresse oxidativo, infiltrado de macrófagos e proliferação de células de músculo liso.

Palavras-chave: Aterosclerose, *O*-Glicosilação com N-acetil-glucosamina, Lisofosfatidilcolina

Abstract

MENDES, AC. **Glycosylation with *O*-linked β -N-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) and events that contribute to atherosclerotic plaque formation.** 2020. 166 p. Dissertation (Master of Sciences in Pharmacology) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2020.

Atherosclerosis is a chronic and inflammatory pathological condition that affects large and medium-sized arteries and represents a risk for clinical outcomes such as myocardial infarction and stroke. Protein modification by Glycosylation with *O*-linked β -N-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) affects vascular function, inflammatory processes and oxidative stress, events that are also altered in atherosclerosis. Therefore, this post-translational protein modification may have a role in atherosclerosis progression and development. Male C57BL/6J wild-type (WT) and apolipoprotein E deficient (ApoE^{-/-}) mice were used. ApoE^{-/-} mice exhibited a dyslipidemic profile, plaque formation in the aortic arch and intense local oxidative stress. In addition, the level of *O*-GlcNAc-modified proteins was increased in plaque regions. ApoE^{-/-} mice showed increased tumor necrosis factor alpha (TNF- α) concentration in epididymal fat and high serum nitrite concentrations, parameters that were inhibited by Thiamet G, a drug that increases the rate of proteins modified by *O*-GlcNAc. ApoE^{-/-} mice displayed endothelial dysfunction and lysophosphatidylcholine (LPC), an atherogenic lipid, decreased endothelium-dependent vasodilator responses. Thiamet G did not affect these vascular function parameters. In endothelial cells, LPC reduced the basal production of nitric oxide (NO) and increased reactive oxygen species (ROS). In these cells, LPC also intensified the level of proteins modified by *O*-GlcNAc, in response to Thiamet G, and decreased the phosphorylation of the activation residue (Serine 1177) of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Reduced TNF- α and serum nitrite levels induced by Thiamet G suggests that modification by *O*-GlcNAc generates anti-inflammatory effects. Further studies are needed to evaluate the effects of the modification by *O*-GlcNAc on other disease events such as oxidative stress, macrophages infiltration and smooth muscle cells proliferation.

Keywords: Atherosclerosis, Glycosylation with *O*-linked β -N-acetylglucosamine, Lysophosphatidylcholine

Lista de abreviaturas e siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	serotonina
AA	ácido araquidônico
Acetil-CoA	acetilcoenzima A
ACh	acetilcolina
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
Ang II	angiotensina II
ANOVA	análise de variância
ApoE ^{-/-}	<i>knockouts</i> para apolipoproteína E
ASO	oligonucleotídeos antisense
ATP	adenosina trifosfato
AVE	acidente vascular encefálico
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA-FMRP-USP	Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
cPLA ₂	fosfolipase A ₂ citosólica
CRP	proteína C reativa
COX	ciclooxigenase
COX-1	ciclooxigenase 1
COX-2	ciclooxigenase 2
Ct	ciclo limiar
CuZn-SOD	superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DAF-2 DA	diaminofluoresceína diacetato
DAMPs	padrões moleculares associados a danos
DEPC	dietil pirocarbonato
DHE	diidroetidina
DMEM	meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DOCA	acetato de desoxicorticosterona
EGTA	ácido egtázico

ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
E.P.M	erro padrão da média
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	espécies reativas do oxigênio
ET-1	endotelina-1
GalNAc	N-acetil-galactosamina
GFAT	L-glutamina:D-frutose-6-fosfato amidotransferase
GlcNAc	N-acetil-glucosamina
GlcNAc-1P	N-acetil-glucosamina-1-fosfato
GlcNAc-6P	N-acetil-glucosamina-6-fosfato
GPI	glicofosfatidilinositol
GRO- α	oncogene regulado por crescimento alfa
GSH	glutathione reduzida
HDL	lipoproteína de alta densidade
HE	hematoxilina e eosina
HMG CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HUVEC	células endoteliais de veia umbilical humana
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
IFN- γ	interferon gama
IL-1 β	interleucina-1 beta
IL-4	interleucina-4
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
IL-10	interleucina-10
IL-12	interleucina-12
IM	infarto do miocárdio
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
L-NAME	N(ω)-nitro-L-arginina metil éster
LCAT	lecitina:colesterol aciltransferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LOX-1	receptor de lipoproteína de baixa densidade oxidada do tipo lectina
LPC	lisofosfatidilcolina
LPL	lipase de lipoproteína

MCP-1	proteína quimiotática de monócitos-1
MMP	metaloproteinases de matriz extracelular
Mn-SOD	superóxido dismutase dependente de manganês
MTTP	proteína de transferência de triglicerídeos microsomal
NAD(P)H	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	fator nuclear kappa B
NK	exterminadoras naturais
NOX	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NOX1	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase 1
NOX2	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase 2
NOX4	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase 4
NOX5	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase 5
NPS	nitroprussiato de sódio
NPC1L1	proteína C1-símile de Niemann-Pick 1
OGA	<i>O</i> -GlcNAcase
<i>O</i> -GlcNAc	<i>O</i> -glicosilação com N-acetil-glucosamina
OGT	<i>O</i> -GlcNAc transferase
OPN	osteopontina
oxLDL	lipoproteína de baixa densidade oxidada
PBS	tampão salina fosfato
PCSK9	proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9
PE	fenilefrina
PECAM-1	molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1
PI3K	fosfoinositídeo 3-cinase
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGH ₂	prostaglandina H ₂
PGI ₂	prostaciclina
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PPAR-α	receptor alfa ativado pelo proliferador peroxissômico
qRT-PCR	reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa quantitativa em tempo real
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
SDS	dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SOD	superóxido dismutase
SOD1	superóxido dismutase 1
SOD2	superóxido dismutase 2
SR-A1	receptor <i>scavenger</i> classe A tipo 1
SR-B1 ou SR-BI	receptor <i>scavenger</i> classe B tipo 1
SUMO	pequenos modificadores semelhantes à ubiquitina
TBS-T	tampão tris-salina contendo Tween 20
TGF- β	fator de transformação do crescimento beta
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
Trx-1	tio redoxina-1
TXA ₂	tromboxano A ₂
UDP	uridina difosfato
UDP-GlcNAc	uridina difosfato-N-acetil-glucosamina
URL	unidades relativas de luminescência
UTP	uridina trifosfato
VBH	via de biossíntese das hexosaminas
VCAM-1	molécula de adesão celular-vascular 1
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
WT	selvagens

Lista de fórmulas químicas

LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

-CH ₃	grupo metil
-COCH ₃	grupo acetil
CaCl ₂ .2H ₂ O	cloreto de cálcio diidratado
CO ₂	dióxido de carbono
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio
HO·	radical hidroxila
HO ₂ ·	radical hidroperoxil
HOCl	ácido hipocloroso
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico
MgSO ₄ .7H ₂ O	sulfato de magnésio heptaidratado
Na ₂ EDTA	sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético
Na ₃ VO ₄	ortovanadato de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaF	fluoreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NO	óxido nítrico
NO ₂	grupo nitro
O ₂ · ⁻	radical ânion superóxido
ONOO ⁻	peroxinitrito
PO ₄ ³⁻	fosfato
PPi	pirofosfato
SO ₄ ²⁻	sulfato

Lista de unidades de medida

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

°C	graus Celsius
µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µm	micrômetro(s)
µM	micromolar
cm	centímetro(s)
dL	decilitro(s)
g	grama(s)
h	hora(s)
kDa	quilodáton(s)
kg	quilograma(s)
M	molar
mg	miligrama(s)
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mM	milimolar
mN	milinewton(s)
N	normal
ng	nanograma(s)
nm	nanômetro(s)
p/p	peso por peso
pg	picograma(s)
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação(ões) por minuto
seg	segundo(s)
u.a.	unidade(s) arbitrária(s)
UI	unidade(s) internacional(is)
V	volts

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do metabolismo das lipoproteínas.....	48
Figura 2 – Elementos da formação e progressão da placa aterosclerótica.	64
Figura 3 – VBH e modificação por <i>O</i> -GlcNAc.....	73
Figura 4 – Esquema representativo da hipótese.	79
Figura 5 – Massa corporal de camundongos WT tratados com veículo e ApoE ^{-/-} tratados com veículo ou Thiamet G.	101
Figura 6 – Secções transversais de arco aórtico de animais WT (western) e ApoE ^{-/-} (western) corados com HE.	103
Figura 7 – Expressão gênica de enzimas do sistema redox.	104
Figura 8 – Emissão de fluorescência por DHE no arco aórtico de camundongos WT (western) e ApoE ^{-/-} (western).	105
Figura 9 – Dosagens de citocinas na gordura epididimal e no tecido adiposo perivascular da aorta torácica de animais WT (chow) e ApoE ^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G.	106
Figura 10 – Expressão gênica das enzimas reguladoras da modificação por <i>O</i> -GlcNAc.	107
Figura 11 – Expressão de proteínas modificadas por <i>O</i> -GlcNAc em arco aórtico de camundongos WT (western) e ApoE ^{-/-} (western) determinada por Western Blotting.	108
Figura 12 – Expressão proteica das enzimas reguladoras da <i>O</i> -GlcNAc em arco aórtico de camundongos WT (western) e ApoE ^{-/-} (western) determinada por Western Blotting.	109
Figura 13 – Curvas concentração-resposta para ACh em aortas torácicas de camundongos WT (chow) e ApoE ^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G.....	110
Figura 14 – Curvas concentração-resposta para PE em aortas torácicas de camundongos WT (chow) e ApoE ^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G.....	111
Figura 15 – Curvas concentração-resposta para NPS em aortas torácicas de camundongos WT (chow) e ApoE ^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G.....	111
Figura 16 – Curvas concentração-resposta para ACh em aortas torácicas de camundongos WT incubadas com veículo ou LPC na presença de veículo ou Thiamet G.....	113
Figura 17 – Curvas concentração-resposta para PE em aortas torácicas de camundongos WT incubadas com veículo ou LPC na presença de veículo ou Thiamet G.....	114
Figura 18 – Curvas concentração-resposta para NPS em aortas torácicas de camundongos WT incubadas com veículo ou LPC na presença de veículo ou Thiamet G.....	114

Figura 19 – Concentração sérica de nitrito em animais WT (chow) e ApoE ^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G.	116
Figura 20 – Geração de O ₂ ^{·-} induzida por LPC estimada pelo ensaio de lucigenina em células endoteliais.....	116
Figura 21 – Expressão de proteínas modificadas por O-GlcNAc determinada por Western Blotting em células endoteliais estimuladas com LPC 10 ⁻⁵ M ou PBS [controle (C)] por 24 h na presença de veículo ou Thiamet G.	118
Figura 22 – Produção de NO basal avaliada por fluorimetria usando a sonda DAF-2 DA em células endoteliais estimuladas com LPC 10 ⁻⁵ M ou PBS (controle) por 24 h na presença de veículo ou Thiamet G.	119
Figura 23 – Geração de espécies reativas do oxigênio avaliada por fluorimetria usando DHE em células endoteliais estimuladas com LPC 10 ⁻⁵ M ou PBS (controle) por 24 h na presença de veículo ou Thiamet G.	120
Figura 24 – Expressão de eNOS total e fosforilada no sítio de serina 1177 determinada por Western Blotting em células endoteliais estimuladas com LPC 10 ⁻⁵ M ou PBS [controle (C)] por 24 h na presença de veículo ou Thiamet G.	121
Figura 25 – Expressão de NOX4 determinada por Western Blotting em células endoteliais estimuladas com LPC 10 ⁻⁵ M ou PBS [controle (C)] por 24 h na presença de veículo ou Thiamet G.	122

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos usados nos ensaios de Western Blotting.	94
Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos de animais WT (chow) e ApoE ^{-/-} (western) tratados com Thiamet G ou veículo.	102
Tabela 3 – Valores de Rmax para PE, ACh e NPS em aortas torácicas provenientes de camundongos WT e ApoE ^{-/-} tratados com Thiamet G ou veículo.....	112
Tabela 4 – Valores de <i>p</i> D2 para PE, ACh e NPS em aortas torácicas provenientes de camundongos WT e ApoE ^{-/-} tratados com Thiamet G ou veículo.....	112
Tabela 5 – Valores de Rmax para PE, ACh e NPS em aortas torácicas provenientes de camundongos WT incubadas com LPC na presença de veículo ou Thiamet G.	115
Tabela 6 – Valores de <i>p</i> D2 para PE, ACh e NPS em aortas torácicas provenientes de camundongos WT incubadas com LPC na presença de veículo ou Thiamet G.	115

Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução	34
2. Revisão da literatura	38
2.1 Aterosclerose	38
2.1.1 Aspectos históricos da aterosclerose: da antiguidade aos dias atuais	38
2.1.2 Epidemiologia das doenças cardiovasculares e da aterosclerose	41
2.1.3 Fisiopatologia da aterosclerose	42
2.1.3.1 Disfunção endotelial inicial e a influência das forças hemodinâmicas	42
2.1.3.2 O metabolismo de lipídeos e lipoproteínas e as implicações do excesso de colesterol circulante na doença aterosclerótica	44
2.1.3.3 O papel das citocinas, moléculas de adesão e oxLDL no contexto inflamatório da aterosclerose.....	49
2.1.3.4 Efeitos da regulação anti-inflamatória na aterosclerose	53
2.1.3.5 Mediadores alternativos da inflamação na aterosclerose	55
2.1.3.6 O estresse oxidativo na aterosclerose e a relevância da oxLDL nesse processo	56
2.1.3.7 Controle do estresse oxidativo na aterosclerose	58
2.1.3.8 Mecanismos paralelos de lesão tecidual e demais alterações mediadas por oxLDL e seus lipídeos derivados.....	59
2.1.3.9 Componentes celulares, estruturais e moleculares da placa aterosclerótica.....	60
2.1.4 Abordagens terapêuticas atuais e futuras no manejo da aterosclerose.....	64
2.2 <i>O</i> -GlcNAc	68
2.2.1 Uma visão geral das modificações pós-traducionais.....	68
2.2.2 Modificações de eventos celulares por <i>O</i> -GlcNAc	70
2.2.3 A via de biossíntese das hexosaminas (VBH): a cascata bioquímica da modificação por <i>O</i> -GlcNAc	71
2.2.4 <i>O</i> -GlcNAc e doenças cardiovasculares	74
3. Justificativa.....	77
4. Hipótese.....	79
5. Objetivos.....	81
5.1 Objetivo geral	81
5.2 Objetivos específicos	81
6. Material e métodos	83
6.1 Animais	83
6.2 Dieta hipercolesterolêmica e indução de aterosclerose	83

6.3 Tratamento farmacológico	84
6.4 Determinação da massa corporal dos animais	84
6.5 Cultivo de células endoteliais humanas	84
6.6 Avaliação da função vascular	85
6.7 Análises bioquímicas	87
6.8 Análises histológicas.....	88
6.9 Avaliação da geração de EROs <i>in situ</i> por diidroetidina (DHE)	88
6.10 Avaliação da expressão gênica	89
6.11 Avaliação da expressão proteica.....	92
6.11.1 Extração de proteínas	92
6.11.2 Dosagem de proteínas por Bradford.....	93
6.11.3 Western Blotting	93
6.12 Dosagem de citocinas	95
6.13 Método de Griess	97
6.14 Avaliação da geração de O ₂ ⁻	97
6.15 Determinação da produção de NO <i>in vitro</i> por fluorimetria de diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA)	98
6.16 Avaliação da geração de EROs <i>in vitro</i> por fluorimetria de DHE.....	98
6.17 Análise Estatística.....	99
7. Resultados.....	101
7.1 Experimentos <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	101
7.1.1 Animais ApoE ^{-/-} (western) apresentam maior ganho de massa corporal em relação aos camundongos WT (chow).....	101
7.1.2 O tratamento com Thiamet G não altera a evolução ponderal dos camundongos ApoE ^{-/-} (western).....	102
7.1.3 Camundongos ApoE ^{-/-} (western) apresentam perfil dislipidêmico	102
7.1.4 Thiamet G não altera as concentrações séricas de lipídeos ou glicose dos animais	102
7.1.5 Camundongos ApoE ^{-/-} (western) apresentam formação de placas ateroscleróticas no arco aórtico.....	103
7.1.6 Há aumento da expressão gênica da enzima NOX4 em região de placa aterosclerótica.....	103
7.1.7 Camundongos ApoE ^{-/-} (western) exibem estresse oxidativo no arco aórtico	104
7.1.8 Camundongos ApoE ^{-/-} (western) tendem a apresentar um perfil inflamatório maior em relação a animais WT (chow) no que se refere à produção de citocinas inflamatórias	105

7.1.9 Thiamet G reduz a produção de TNF- α na gordura epididimal de animais ApoE ^{-/-} (western).....	106
7.1.10 Há aumento de expressão gênica vascular das enzimas que regulam a modificação por O-GlcNAc em região de estresse de cisalhamento turbilhonado.....	107
7.1.11 A expressão de proteínas modificadas por O-GlcNAc é maior em arco aórtico contendo placas ateroscleróticas	107
7.1.12 Há maior expressão proteica das enzimas reguladoras da modificação por O-GlcNAc em arco aórtico contendo placas ateroscleróticas	108
7.1.13 Animais ApoE ^{-/-} (western) apresentam disfunção endotelial e o tratamento com Thiamet G não interfere nessa resposta.....	109
7.1.14 Em camundongos ApoE ^{-/-} (western), as respostas à PE e ao NPS não estão alteradas.....	110
7.1.15 LPC diminui a resposta vasodilatadora à ACh e o Thiamet G tende a piorar esse relaxamento dependente de endotélio	112
7.1.16 LPC não modifica a resposta à PE ou NPS e Thiamet G não altera esses parâmetros	113
7.1.17 O tratamento com Thiamet G atenua a concentração sérica de nitrito.....	115
7.2 Experimentos <i>in vitro</i>	116
7.2.1 LPC aumenta O ₂ ^{•-} em células endoteliais	116
7.2.2 O Thiamet G na concentração de 10 ⁻⁶ M induz aumento de O-GlcNAc em células endoteliais.....	117
7.2.3 LPC não altera a expressão de proteínas modificadas por O-GlcNAc em células endoteliais.....	117
7.2.4 LPC intensifica o aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc induzido por Thiamet G.....	117
7.2.5 LPC diminui a produção basal de NO em células endoteliais	118
7.2.6 Thiamet G não modifica a redução da produção basal de NO em células endoteliais estimuladas por LPC	118
7.2.7 LPC gera estresse oxidativo em células endoteliais.....	119
7.2.8 Thiamet G não altera o estresse oxidativo induzido por LPC em células endoteliais	119
7.2.9 LPC diminui a fosforilação dos sítios de ativação em serina 1177 da eNOS em células endoteliais na presença de veículo ou Thiamet G	120
7.2.10 Thiamet G não modifica a diminuição induzida por LPC da fosforilação do sítio de ativação (serina 1177) da eNOS	120
7.2.11 A LPC não altera a expressão de eNOS em células endoteliais na presença de veículo ou Thiamet G	121
7.2.12 A expressão de NOX4 em células endoteliais não se altera com estímulo promovido por LPC na presença de veículo ou Thiamet G	121

8. Discussão	124
9. Conclusão	132
10. Referências bibliográficas	134
11. Anexos.....	166
11.1 Certificado da CEUA-FMRP-USP	166

Introdução

1. Introdução

A aterosclerose é uma condição cardiovascular manifestada pelo surgimento de placas na parede interior dos vasos sanguíneos formadas basicamente por gordura, células vasculares e do sistema imunológico, componentes fibrosos e elementos do sistema plaquetário e de coagulação. Como essa doença apresenta caráter crônico e inflamatório, os constituintes da placa aumentam ao longo de sua progressão à medida que a lesão se torna mais complexa (Badimon *et al.*, 2012). A evolução da aterosclerose está associada a desfechos cardiovasculares fatais envolvendo doenças cerebrovasculares e arteriais coronarianas provocadas por estreitamento da luz do vaso e/ou rompimento e trombose (Weber & Noels, 2011), consequências com altas taxas de incidências em todo o mundo e relevância epidemiológica considerável no campo da Medicina Cardiovascular (Song *et al.*, 2020).

A aterosclerose é uma doença que se desenvolve em vasos de grande e médio calibre, preferencialmente em áreas de curvaturas, bifurcações e ramificações onde o estresse de cisalhamento é turbulento (VanderLann *et al.*, 2003). Somado a isso, as lesões ateroscleróticas abrangem a instalação de inflamação envolvendo tipos celulares distintos tanto do sistema imune inato, incluindo monócitos e neutrófilos, quanto do sistema imune adaptativo, como os linfócitos (Weber & Noels, 2011; Ilhan & Kalkanli, 2015). Além disso, a criação de gradientes químicos favorecidos por elementos moleculares do processo inflamatório, como as citocinas e quimiocinas, facilitam a consolidação e avanço das lesões por favorecer recrutamento de células inflamatórias para o sítio afetado e sua adesão à superfície endotelial (Zernecke & Weber, 2010; Koenen & Weber, 2011; Badimon *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2013). Há também a participação de lipoproteínas aterogênicas que, em indivíduos dislipidêmicos, estão em altos níveis circulatórios. Essas moléculas se acumulam no espaço entre a camada média e a íntima e contribuem de maneira bastante significativa para as lesões (Mundi *et al.*, 2018). Além disso, o estresse oxidativo nesses locais de placa é intenso e enzimas proteolíticas liberadas pelas células vasculares e do sistema imunológico estão envolvidas na degradação de matriz extracelular (Galis & Khatri, 2002; Yang *et al.*, 2017). Células vasculares, como as de músculo liso, também integram a fisiopatologia da doença. Por um lado, contribuem para a estabilidade da placa com a síntese de matriz extracelular constituída por colágeno, como acontece normalmente em condições fisiológicas. Sob estímulos aterogênicos, entretanto, as células de músculo liso vascular possuem papel deletério, em geral, pois se proliferam aumentando o conteúdo celular e, por consequência, o tamanho da lesão, refletindo assim, em estreitamento do lúmen vascular. Além disso, esse processo também gera detritos celulares por apoptose ou

necrose, o que aumenta o estresse oxidativo e o processo inflamatório local (Badimon *et al.*, 2012).

A *O*-glicosilação com N-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) é uma modificação pós-traducional de proteínas que apresenta caráter dinâmico e reversível. O substrato adicionado às proteínas modificadas é um monossacarídeo oriundo de um açúcar nucleotídico acetilado, uma hexosamina formada após sucessivas reações bioquímicas na molécula de glicose, substrato inicial nessa via. Os sítios alvo são resíduos de serina e treonina de proteínas, as quais, uma vez modificadas, podem apresentar alterações em suas atividades, função e localização intracelular. Essas alterações culminam em modificações de eventos celulares, como tradução, transcrição, sinalização e metabolismo e, consequentemente, em alteração da função celular (Liu *et al.*, 2018; Akella *et al.*, 2019).

No que tange aos eventos celulares e moleculares presentes na aterosclerose, estudos demonstram que a modificação por *O*-GlcNAc interfere com vários desses eventos. Essa modificação afeta desde células individuais até tecidos inteiros do sistema cardiovascular e em circunstâncias associadas ou não a eventos inflamatórios ou oxidativos.

Em células de músculo liso vascular, por exemplo, as alterações por *O*-GlcNAc influenciam o padrão de resposta inflamatória por interferir na expressão de mediadores inflamatórios incluindo citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e a atividade de fatores de transcrição pró-inflamatórios (Xing *et al.*, 2011). Em células endoteliais, o aumento de *O*-GlcNAc altera a ativação celular induzida por citocinas, como resultado de interferências na sinalização de fatores transcricionais pró-inflamatórios, refletindo em diferenças na expressão de quimiocinas e moléculas de adesão (Ju *et al.*, 2008). Drogas que aumentam a taxa de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc também alteram o infiltrado de granulócitos e monócitos em artérias submetidas à injúria endoluminal, o que é decorrente de mudanças no perfil da produção de quimiocinas e da expressão de moléculas de adesão nas artérias lesionadas desses animais (Xing *et al.*, 2008).

Como resultado ao aumento de *O*-GlcNAc, a resposta contrátil de anéis arteriais a estímulos vasoconstritores aumenta, assim como o relaxamento dependente de endotélio diminui. Esses efeitos estão relacionados a alterações na atividade de diversas proteínas endoteliais que regulam o citoesqueleto, como a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, as enzimas fosfolipase C, proteína cinase C, da via da Akt ou proteína cinase B e óxido nítrico sintase, que sintetiza uma importante molécula vasodilatadora, o fator relaxante derivado do endotélio, cujos pormenores e implicações na aterosclerose serão discutidos a frente. Esses

estudos demonstram uma conexão entre essa modificação pós-traducional e funções vasculares alteradas ou anormais, como acontece na aterosclerose (Lima *et al.*, 2008).

Esses estudos demonstram interação entre a *O*-GlcNAc e processos envolvidos nas alterações vasculares inflamatórias ou funcionais, separadamente. No entanto, a resposta das modificações de proteínas por *O*-GlcNAc na interação simultânea entre inflamação e função vascular também já foi documentada. Experimentos de reatividade vascular demonstram que a disfunção vascular induzida por citocinas pró-inflamatórias pode ser modulada por agentes que afetam a taxa de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. O uso dessas ferramentas reflete em mudanças nos perfis de contração e relaxamento vascular sob estímulos inflamatórios (Hilgers *et al.*, 2012). Esse é um exemplo de como as características vasculares funcionais e inflamatórias podem estar interligadas, como ocorre na aterosclerose, e de como essa conexão pode formar um elo fundamental com as mudanças induzidas pela *O*-GlcNAc.

A modificação por *O*-GlcNAc também é importante no controle do ambiente redox, regulando o estresse oxidativo, como demonstrado em cardiomiócitos (Ngho *et al.*, 2011), rins (Hu *et al.*, 2017) e artérias (Souza-Silva *et al.*, 2018).

Partindo desse pressuposto, as evidências indicam que a modificação por *O*-GlcNAc modula eventos importantes na fisiopatologia da aterosclerose, como estresse oxidativo, inflamação e disfunção vascular. Logo, essa modificação de proteínas pode então ter papel chave nessa condição patológica.

Revisão da literatura

2. Revisão da literatura

2.1 Aterosclerose

2.1.1 Aspectos históricos da aterosclerose: da antiguidade aos dias atuais

A história das investigações acerca do funcionamento do sistema cardiovascular e suas complicações remonta a tempos antigos, começando em apenas alguns anos depois de Cristo com as descobertas de Galeno sobre o coração e o movimento do sangue através das artérias, bem como pelos seus trabalhos envolvendo a origem e a descrição do pulso. Galeno, que foi um médico e filósofo romano de origem grega, também contribuiu para o conhecimento na área de fisiologia cardiorrespiratória ao explicar mecanismos básicos da respiração e da interação entre esses dois sistemas. O sistema cardiovascular proposto por Galeno era aberto, pois, apesar de não haver conexão direta entre as câmaras esquerda e direita do coração, ele postulava que o sangue fluía entre ambos os lados através de poros invisíveis presentes no septo que as separam (Sternbach *et al.*, 2001; Slijkhuis *et al.*, 2009). Novos conceitos só voltariam a ser estabelecidos a partir de informações publicadas em 1628, com base nos relatos feitos pelo médico britânico William Harvey a respeito do caminho traçado pelo sangue através da circulação e também por sua consideração em relação à fase ativa do movimento do coração, chamada de sístole, como sendo a responsável pela força propulsora fornecida ao fluxo sanguíneo. Somente sua descoberta acerca da rota pulmonar do sangue – em que o lado direito do coração é ligado ao pulmão pela artéria pulmonar e o lado esquerdo é ligado pelas veias pulmonares, sendo o pulmão o denominador comum do fluxo sanguíneo entre ambos os lados cardíacos – somada à epifania de que não existiam tais poros no septo, permitiu a formação de um conceito concreto de circulação e a proposição de que o sistema cardiovascular é, portanto, fechado. A proposição gerou também a indagação sobre o porquê Galeno, tão próximo da resposta, não conseguiu estabelecer o conceito. Esse conhecimento, por sua vez, foi complementado somente em 1661 quando Malpighi, devido ao advento da microscopia, descobriu a presença dos capilares sanguíneos (Silverman, 1985; Slijkhuis *et al.*, 2009).

A descrição de aterosclerose foi feita primeiramente por Leonardo da Vinci por volta dos séculos XV e XVI, quando ele relatou sobre a restrição do fluxo sanguíneo em pessoas mais velhas devido ao enrijecimento e estreitamento das túnicas vasculares (Slijkhuis *et al.*, 2009). No século XVII, Edward Hyde observando as queixas do seu pai adoecido, apesar de não ser médico, fez a primeira descrição do sintoma de dor precordial acompanhada de palidez, que viria a ser chamada de angina *pectoris* ou simplesmente angina. O primeiro relato médico, por sua vez, foi feito em 1768 por um britânico chamado William Heberden. Ele nomeou condições

semelhantes às do pai de Edward Hyde como angina e descreveu o sintoma como sendo uma sensação de aflição acompanhada por dor e desconforto na região do peito (Khan *et al.*, 2002; Slijkhuis *et al.*, 2009).

Uma década depois, em 1778, Edward Jenner, que também descobriu a vacina da varíola, escreveu uma carta a William Heberden contendo um relato de suas observações ao dissecar o cadáver de um indivíduo que sofria de angina. A artéria coronária do homem morto foi descrita como um tubo carnoso ossificado com coágulo. Heberden ainda acrescentou que o coração estava carregado de gordura e os vasos apresentavam-se repletos e escondidos naquela substância. Esse achado permitiu o reconhecimento da ligação entre angina e doenças das artérias coronárias. Essa evidência permitiu a primeira sugestão correta acerca da doença cardíaca isquêmica, estabelecendo relação da angina com um mal cardíaco e presença de doença aterosclerótica (Gotto, 1985; Linden *et al.*, 2014).

Alguns anos depois, em 1799, Caleb Hillier Parry, um médico britânico assim como William Heberden, paralelamente também confirmou a causa da angina em um de seus experimentos sobre circulação e deficiências no suprimento vascular, através do achado de uma substância endurecida em artérias coronárias durante uma autópsia de ovelha. Ainda assim, reconheceu o mérito e atribuiu a Edward Jenner a descoberta e ideia original em relação a angina ser resultado da ossificação ou também de uma má-organização da estrutura das artérias coronárias. Àquela altura, ossificação era o nome comumente dado à calcificação dos vasos (Hull, 1998; Lerner, 2005; Slijkhuis *et al.*, 2009).

O conceito dessa desorganização interna das artérias, por sua vez, foi concebido em um livro publicado pelo cirurgião e anatomista italiano Antonio Scarpa. Sua obra explicou que estas doenças, nas quais às vezes a substância endurecida no interior dos vasos cardíacos amolece, predispondo-os a ulceração e ruptura, são comuns em artérias. Sua declaração sobre essas lesões gordurosas e ulceradas considerou inclusive que esses eventos seriam a causa de uma condição que ainda seria nomeada arteriosclerose, anos mais tarde (Gotto, 1985).

A partir do final do século XVIII e em meados dos anos 1800, a discussão sobre a aterosclerose se dividiu entre duas hipóteses: a teoria trombogênica sugerida por Carl von Rokitansky e a teoria inflamatória proposta por Rudolf Virchow. A primeira delas postulava que os depósitos nas artérias eram derivados de fibrina e outros elementos do sangue incluindo proteínas e colesterol. A segunda, por sua vez, justificava a formação do ateroma como resultado de um processo inflamatório em que forças mecânicas iniciariam o estímulo irritativo, que seria acompanhado por espessamento fibroso da íntima provocado pela proliferação de

células de tecido conectivo como tentativa de reparo (Gotto, 1985; Slijkhuis *et al.*, 2009; Linden *et al.*, 2014).

Como já foi mencionado, a palavra arteriosclerose propriamente dita só surgiu depois das considerações de Antonio Scarpa. Tal termo foi cunhado em 1833 pelo patologista Jean-Frederick Lobstein, que usava essa expressão nos tratados que escrevia para se referir ao enrijecimento e estreitamento das artérias. De origem grega, o termo ateroma é derivado de uma palavra cujo significado é “grumos” ou “mingau” e foi trazido à tona, por Albrecht von Haller em 1755. Em 1904, Marchand criou o termo aterosclerose, a partir de uma junção adaptada das palavras arteriosclerose e ateroma, baseado nos seus conceitos referentes e na explicação de Monckeberg feita em 1903, alegando que a etiologia da calcificação da camada média e o consequente endurecimento da parede dos vasos, consistente com a arteriosclerose propriamente dita, era diferente da arteriosclerose da camada íntima que, por sua vez, era congruente com a formação do ateroma e consistia na aterosclerose de fato (Gotto, 1985).

Com base nessas informações e segundo as definições mais atuais, a aterosclerose consiste na formação de lesões gordurosas e fibrosas nas paredes das artérias maiores e médias e inclui também componentes inflamatórios. Dependendo da magnitude, a evolução gradativa do quadro configura a doença propriamente dita e proporciona o desenvolvimento de placas que podem obstruir os vasos e comprometer o fluxo sanguíneo normal (Ross, 1993).

Por algum tempo, a aterosclerose foi considerada uma doença moderna relacionada ao estilo de vida contemporâneo. No entanto, a análise por tomografia computadorizada revelou a presença de calcificações características de lesões ateroscleróticas na vasculatura de múmias de até 4.000 anos pertencentes a populações antigas e de diferentes regiões geográficas ao redor do mundo. Esse estudo mostrou que, na verdade, a aterosclerose surgiu há milênios (Thompson *et al.*, 2013).

Em seus estágios iniciais, a doença é silenciosa e assintomática. Em estados avançados, os sintomas que podem aparecer, se surgirem, são resultantes do estreitamento do lúmen das artérias acometidas. Nessa fase tardia da doença, esses sintomas podem ser gradativos conforme o crescimento da placa ou repentinos, caso haja rompimento da placa com consequente trombose (Sanz & Fayad, 2008). Dentre os sintomas, destaca-se a angina, caracterizada por desconforto torácico e associada à isquemia miocárdica, cuja causa comum é aterosclerose coronariana. Essa manifestação é frequentemente acompanhada por dispneia. Os pacientes experimentam uma combinação de aperto e dor no tórax com sensação de falta de ar ou encurtamento da respiração devido à diminuição do suprimento de sangue e oxigênio ao

coração, comumente ao ventrículo esquerdo, hipóxia e esforço dos músculos respiratórios (Davies, 2001).

Há alguns anos, o diagnóstico era por inserção de cateter para angiografia de raios-X. Atualmente existem técnicas mais modernas e não-invasivas como escaneamento por tomografia computadorizada com contraste, ressonância magnética e ultrassom (Sanz & Fayad, 2008).

2.1.2 Epidemiologia das doenças cardiovasculares e da aterosclerose

Doenças cardiovasculares são a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo, sendo que em 2015 contabilizaram um terço de todas as mortes (Roth *et al.*, 2017). A aterosclerose é uma doença cardiovascular cujos processos associados, tais como estreitamento do lúmen vascular e eventos tromboembólicos (Stary *et al.*, 1995; Spagnoli *et al.*, 2004), são gatilhos para infarto do miocárdio (IM), acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico e doença arterial periférica (Herrington *et al.*, 2016). Esses desfechos clínicos podem surgir de um trombo que continuou a crescer e ocluiu uma artéria ou que se destacou da parede do vaso e, nessa separação, desencadeou liberação de material embólico na circulação que alcançou vasos de menor diâmetro (Stary *et al.*, 1995; Spagnoli *et al.*, 2004). Em 2013, doença isquêmica cardíaca e doenças cerebrovasculares hemorrágicas e isquêmicas contabilizaram 247,9 mortes a cada 100.000 pessoas, representando 84,5% das mortes decorrentes de problemas cardiovasculares (Naghavi *et al.*, 2015).

Vulnerabilidade ou instabilidade são conceitos sinônimos relacionados a características da placa aterosclerótica, indicando risco cardiovascular e maior propensão para eventos clínicos. Essa nomenclatura é oriunda da noção de que dois terços a três quartos das mortes por IM são derivados de um desses perfis de vulnerabilidade, que consiste no rompimento da capa fibrosa que reveste a placa, com posterior trombose (Libby & Pasterkamp, 2015).

Os principais fatores de risco para a aterosclerose incluem alimentação não saudável, caracterizada por dieta rica em gorduras saturadas e trans, sódio e açúcar; condições que constituem as dislipidemias, como altas taxas de colesterol total, triglicerídeos e lipoproteínas maléficas e/ou baixos níveis de lipoproteínas benéficas; pressão arterial elevada; tabagismo; diabetes e/ou resistência à insulina; sobrepeso ou obesidade; sedentarismo; idade avançada; histórico familiar de doenças do coração; estresse e consumo de álcool (Rafieian-Kopaei *et al.*, 2014).

2.1.3 Fisiopatologia da aterosclerose

2.1.3.1 Disfunção endotelial inicial e a influência das forças hemodinâmicas

A aterosclerose é uma doença crônica inflamatória caracterizada pela formação de placas fibro-gordurosas na parede interna de artérias de grande e médio calibre com predileção para áreas de curvaturas e bifurcações. Nesses sítios, o endotélio fica predisposto a um estado pró-aterogênico devido a perturbações no fluxo sanguíneo laminar que alteram o estresse de cisalhamento (Caro *et al.*, 1969; Ross, 1999).

Algumas das primeiras alterações funcionais na aterosclerose ocorrem especialmente no endotélio vascular devido a mudanças na tensão de cisalhamento, que é a pressão tangencial exercida pelo sangue na parede dos vasos. Outros processos patológicos que também contribuem para o desenvolvimento de aterosclerose incluem eventos inflamatórios, oxidativos e acúmulo lipídico, que serão detalhados posteriormente.

O endotélio consiste em uma camada única de células que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos e auxilia na regulação do tônus vascular através da liberação de mediadores como óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e endotelina-1 (ET-1) e modulação da atividade de angiotensina II (Ang II). Outras funções incluem o ajuste da permeabilidade vascular a elementos do plasma, o controle da agregação plaquetária e adesão de leucócitos e o balanço entre atividade protrombótica e profibrinolítica. Em uma situação normal, com o endotélio intacto, geralmente ocorre inibição da agregação plaquetária e não há adesão de leucócitos (Libby *et al.*, 2002a; Landmesser *et al.*, 2004; Sitia *et al.*, 2010).

A doença aterosclerótica tem predileção, por exemplo, pelas curvaturas e ramificações da aorta, bifurcações das carótidas, artérias coronárias e aorta abdominal distal, que são ramos arteriais que compartilham padrões topográficos semelhantes. A maior distribuição de placas ateroscleróticas nessas regiões de curvas e ramificações indica, portanto, o envolvimento de forças hemodinâmicas nesse processo. Quando certos pontos desses ramos vasculares sofrem mudanças no padrão laminar do fluxo sanguíneo, o escoamento começa a apresentar características de estresse de cisalhamento baixo e/ou oscilatório e aumento na turbulência (Topper *et al.*, 1996; Pedersen *et al.*, 1999; Ross, 1999; Davies *et al.*, 2002). Esse padrão turbulento de fluxo pode ativar mecanossensores na célula endotelial através da molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*, PECAM-1). Isso leva à alteração de vias de sinalização intracelular, como a via da fosfoinosítideo 3-cinase (*phosphoinositide 3-kinase*, PI3K) resultando, entre outros eventos, na produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e na ativação do fator nuclear kappa B (*nuclear factor-kappa B*, NF-κB). Dessa forma, ocorre um subsequente aumento na expressão de moléculas de adesão e

produção de mediadores pró-inflamatórios, permitindo a aderência de monócitos às células endoteliais ativadas e contribuindo para a formação da placa de aterosclerose nessas áreas inflamadas devido ao fluxo sanguíneo turbilhonado (Givens & Tzima, 2016).

Ao comparar dois sítios hemodinamicamente distintos, genes que apresentam baixa expressão em regiões de fluxo com perturbação e, conseqüentemente, com predisposição a lesões ateroscleróticas, mas altamente expressos em regiões de fluxo normal e, dessa forma, não propensas a formação de placas, seriam candidatos à classe de genes ateroprotetores. No entanto, genes com perfil oposto de expressão seriam, por sua vez, pró-aterogênicos (Davies *et al.*, 2002). É importante ressaltar que o próprio fluxo sanguíneo laminar induz aumento na expressão de genes ateroprotetores, como da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e ciclooxigenase 2 (COX-2) endotelial, que produzem NO e PGI₂, respectivamente, e que, em conjunto, atuam inibindo alguns eventos aterogênicos como contração, proliferação, crescimento e migração de células do músculo liso vascular, ativação e adesão leucocitária ao endotélio, agregação plaquetária, trombose, acúmulo de colesterol nas células da parede vascular e expressão de moléculas de adesão induzida por citocinas (Topper *et al.*, 1996). Em regiões de fluxo turbulento, por exemplo, a ausência do fluxo laminar reduz a produção de NO dependente de endotélio (Libby *et al.*, 2002a). Vale ressaltar ainda que, em tipos celulares diferentes, a COX-2 gera diferentes eicosanoides, pois primeiramente o produto dessa enzima é a prostaglandina H₂ (PGH₂), que é então convertida a jusante nas outras prostaglandinas por sintases celulares próprias. No endotélio, por exemplo, conforme já foi dito, o prostanoide específico produzido pela COX-2 é a PGI₂ que, por sua vez, é antiaterogênica. É importante salientar que em outras células, como macrófagos que estão ausentes no tecido arterial normal mas estão presentes na lesão aterosclerótica, os vários prostanoides sintetizados a partir da PGH₂ perpetuam o processo inflamatório e são pró-aterogênicos, incluindo, por exemplo, a prostaglandina E₂ (PGE₂), considerada um dos eicosanoides mais aterogênicos. Esses pormenores serão descritos a frente (Cipollone & Fazia, 2006).

Sendo assim, sob o estímulo provocado pelo fluxo sanguíneo turbulento, dentre vários outros considerados nocivos, o endotélio perde a capacidade de manter determinados mecanismos homeostáticos importantes, inclusive os de proteção contra lesões ateroscleróticas. Essa desregulação é chamada de disfunção endotelial e se caracteriza por modificação do endotélio envolvendo prejuízo no controle do tônus vascular com manifestação funcional incluindo diminuição de vasodilatação dependente de endotélio, incrementos na síntese de fatores pró-inflamatórios e prótrombóticos, aumento na permeabilidade vascular e estresse oxidativo. Esse processo também engloba a ativação do endotélio, que consiste em aumento na

expressão de moléculas de adesão, aumento nas interações leucócitos-células endoteliais e migração leucocitária. Vale ressaltar que esses eventos são acompanhados então pela presença de mediadores de defesa e inflamação e que serão discutidos mais detalhadamente em seguida (Libby *et al.*, 2002a; Sitia *et al.*, 2010).

2.1.3.2 O metabolismo de lipídeos e lipoproteínas e as implicações do excesso de colesterol circulante na doença aterosclerótica

Os lipídeos dietéticos são digeridos pela ação de múltiplas lipases gástricas e linguais. Os triacilgliceróis, ou triglicerídeos, são hidrolisados em glicerol e ácidos graxos livres. Os ácidos biliares conjugados, por sua estrutura polar que difere do caráter lipídico apolar, agem como emulsificadores e solubilizam os lipídeos em micelas no duodeno. Os ácidos graxos livres e os mono e diacilgliceróis são absorvidos na mucosa intestinal e reesterificados em triglicerídeos nos enterócitos, um tipo de célula epitelial da camada superficial dos intestinos.

Esses lipídeos reesterificados são empacotados com fosfolipídeos, colesterol, ésteres de colesterol, vitaminas lipossolúveis, apolipoproteínas B48 e apolipoproteínas E para formar as partículas que são chamadas de quilomícron. As apolipoproteínas são proteínas que ligam os lipídeos para formar as lipoproteínas, que são os transportadores de lipídeos no sangue e na linfa. Devido ao seu grande tamanho, para passarem pelas membranas capilares, os quilomícrons são secretados nos ductos linfáticos lacteais alcançando o sistema venoso através do ducto torácico, um grande canal linfático de onde os quilomícrons depois de absorvidos são transportados direto para o sistema venoso portal e para o fígado. Ácidos graxos de cadeia curta e média, por serem mais hidrossolúveis, difundem-se diretamente para a corrente sanguínea do sistema porta, ao invés de serem reesterificados, convertidos em triglicerídeos, incluídos com outras moléculas formando os quilomícrons e serem absorvidos pelos vasos linfáticos (Cooper, 1997; Uauy & Castillo, 2003; César *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2007; Vaziri, 2013; Feingold & Grunfeld, 2018).

Sendo assim, os quilomícrons transportam lipídeos derivados da ingestão alimentar, incluindo tanto triglicerídeos quanto colesterol. Não apenas os lipídeos de origem exógena, aqueles integralmente da dieta, são transportados por essas lipoproteínas, mas também os de origem endógena, que são aqueles sintetizados pelo organismo, como é o caso do colesterol presente na bile excretada no lúmen intestinal. Diferentemente dos triglicerídeos incorporados aos quilomícrons, que são exclusivamente dietéticos, o colesterol empacotado nos quilomícrons pode ter caráter tanto exógeno quanto endógeno, mas vale ressaltar que dos tipos de lipídeos presentes nessa lipoproteína, o colesterol endógeno corresponde à maior parte deles. Os

triglicerídeos da dieta e o colesterol são então carregados por essa lipoproteína e direcionados, respectivamente, para os tecidos periféricos e para o fígado (Huff, 2003; Uauy & Castillo, 2003; César *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2007; Feingold & Grunfeld, 2018). Ao longo da circulação, os quilomícrons perdem progressivamente o conteúdo de triglicerídeos, devido à hidrólise dessas moléculas pela lipase de lipoproteína (*lipoprotein lipase*, LPL) presente nas células endoteliais, para formar ácidos graxos livres. Estes são captados pelos músculos e tecido adiposo adjacentes para produção de energia e reserva na forma de triglicerídeos, respectivamente. A apolipoproteína C-II é um cofator para a atividade da LPL, enquanto que a apolipoproteína C-III inibe a ação dessa enzima. A hidrólise da maior parte dos triglicerídeos e de alguns fosfolipídeos pela LPL é a primeira etapa do catabolismo dos quilomícrons, que depois disso se tornam partículas chamadas de quilomícrons remanescentes. Os quilomícrons remanescentes seguem para a segunda fase do catabolismo, sendo captados pelo fígado, provavelmente por endocitose, sendo metabolizados no interior dos hepatócitos (Havel, 1984; Mahley *et al.*, 1989; Cooper, 1997; Uauy & Castillo, 2003; César *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2007; Goldberg *et al.*, 2009; Vaziri, 2013; Feingold & Grunfeld, 2018).

Enquanto os quilomícrons transportam triglicerídeos que são exclusivamente da dieta, além de colesterol endógeno e também exógeno, o fígado produz e secreta lipoproteína de muito baixa densidade (*very low density lipoprotein*, VLDL) contendo as apolipoproteínas B-100 e E, sendo rica em triglicerídeos endógenos junto a colesterol também sintetizado endogenamente. A VLDL também está sujeita à ação da LPL que libera ácidos graxos livres para os tecidos com finalidade direcionada ao metabolismo energético, bem como para o tecido adiposo, onde são armazenados em adipócitos na forma de reserva energética. Após a entrega de triglicerídeos como fonte de consumo de energia para os tecidos periféricos, incluindo principalmente os músculos esquelético e cardíaco, e de colesterol para a síntese de membrana e de esteroides, as partículas de VLDL se tornam remanescentes de VLDL, também chamadas de lipoproteína de densidade intermediária (*intermediate density lipoprotein*, IDL). Essas partículas de VLDL remanescentes ou IDL são captadas pelo fígado assim como ocorre com os remanescentes de quilomícrons ou são convertidas em lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein*, LDL) após perda de componentes do núcleo e da superfície. Nesse sentido, vale salientar que a internalização pelos hepatócitos é secundária no metabolismo dessas lipoproteínas que eram ricas em triglicerídeos, porque não só os quilomícrons que sofreram a ação da LPL e se tornaram remanescentes, mas também as partículas de VLDL que passaram pelo mesmo processo são mais rapidamente captados pelo fígado do que os outros quilomícrons e partículas de VLDL que são nascentes ou não foram metabolizados pela LPL permanecendo intactos (Havel, 1984;

Cooper, 1997; Uauy & Castillo, 2003; Lee *et al.*, 2003; César *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2007; Goldberg *et al.*, 2009; Bie *et al.*, 2013; Vaziri, 2013; Feingold & Grunfeld, 2018).

É importante ressaltar que a apolipoproteína E, por ser um ligante de alta afinidade a receptores de depuração como o receptor de LDL, é relevante na captação hepática dos remanescentes de quilomícrons e de VLDL que, por sua vez, estão carregados de colesterol e com pouco conteúdo de triglicerídeos. As apolipoproteínas C, no entanto, são inibidoras dessa captação, especialmente a apolipoproteína C-I (Havel, 1984; Mahley *et al.*, 1989; Cooper, 1997; César *et al.*, 2006; Getz & Reardon, 2009; Feingold & Grunfeld, 2018; Getz & Reardon, 2018).

A LDL transporta o colesterol para os tecidos periféricos e, estando em níveis elevados no sangue, lipídeos podem se depositar no lúmen das artérias levando à formação de placa, espessamento e estreitamento do vaso consistente com a aterosclerose. Essas lipoproteínas são pobres em triglicerídeos e ricas em colesterol sendo incumbidas também de entregá-lo de volta ao fígado, mas através da ação da lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*, HDL) responsável pelo transporte reverso de colesterol da periferia para o fígado (Lee *et al.*, 2003; Kwan *et al.*, 2007; Feingold & Grunfeld, 2018; Soliman, 2018).

O plasma contém partículas de α -HDL bem como apolipoproteína A-I, que é produzida pelo fígado e intestino sendo liberada na circulação. A de origem intestinal chega ao sangue através dos quilomícrons. As apolipoproteínas A-I e A-II então se associam à HDL que se torna pré- β -HDL. A captação de fosfolipídeos e colesterol gera a HDL nascente discoidal contendo algumas moléculas de apolipoproteínas A-I e A-II. A enzima lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) esterifica esse colesterol e a HDL deixa de ser discoide e vai se transformando em uma partícula esférica madura. O transporte reverso de colesterol consiste na passagem de colesterol vindo de células periféricas carregadas com excesso desse lipídeo, pela HDL, para o fígado. Esse transporte pode ocorrer por duas rotas. Na direta, a própria HDL carrega o colesterol para o fígado por interação com o receptor *scavenger* classe B tipo 1 (SR-B1 ou SR-BI). Nesse modo, o colesterol incorporado nessa lipoproteína deriva de seu efluxo a partir das outras células através de difusão simples, difusão facilitada por SR-B1 ou efluxo mediado por transportadores de cassete de ligação de adenosina trifosfato (ATP). Na via indireta, a intercambiável apolipoproteína E é translocada da HDL para a LDL, sendo transferida na forma de complexo lipídico. Essa apolipoproteína é um ligante dos receptores de LDL no fígado permitindo a captação dessas lipoproteínas (Lee *et al.*, 2003; Fazio & Linton, 2004; Kwan *et al.*, 2007; Getz & Reardon, 2009; Karavia *et al.*, 2012; Bie *et al.*, 2013; Feingold & Grunfeld, 2018; Getz & Reardon, 2018; Soliman, 2018; Ouimet *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a dislipidemia é um importante fator de risco para a aterosclerose. Essa condição é caracterizada não só pela alta concentração plasmática de colesterol total, mas principalmente de colesterol associado a LDL, com ou sem redução de colesterol associado a HDL. Esse aumento no colesterol sérico pode vir acompanhado ou não de taxas elevadas de triglicerídeos. Como foi visto, a LDL, por sua vez, é uma partícula circulante composta por proteínas e lipídeos e sua função é o transporte e a entrega de colesterol endógeno para as células do corpo, visto que o colesterol não circula livremente no sangue. O desenvolvimento de aterosclerose e o risco cardiovascular está correlacionado, portanto, justamente a concentrações séricas elevadas dessa lipoproteína em especial (Goldstein & Brown, 1977; Nelson, 2013). As partículas de LDL em excesso na circulação além de ficarem mais propensas a se acumular na íntima vascular, estão sujeitas a oxidação por enzimas e EROs, tornando-se partículas de LDL oxidada (*oxidized LDL*, oxLDL) que, por sua vez, possuem efeitos fisiopatológicos importantes na aterosclerose (Steinberg, 1997; Hansson & Libby, 2006).

Além disso, sabe-se que a disfunção endotelial, ao comprometer os mecanismos de controle de permeabilidade vascular aos constituintes do plasma, facilita o acúmulo de lipídeos na parede arterial. No entanto, a disfunção endotelial não é somente uma causa para a retenção de colesterol e/ou de seus produtos de oxidação, mas também é um fenômeno resultante ou agravado por esse acúmulo de gordura que, por sua vez, favorece ainda mais esse processo, aumentando a permeabilidade vascular a macromoléculas e intensificando o depósito lipídico, sendo portanto uma relação de causa e consequência (Rong *et al.*, 1998). A hiperglicemia presente no diabetes é outro fator agravante da disfunção endotelial pois, em conjunto à hiperlipidemia, promove mecanismos pró-aterogênicos, como estresse oxidativo, redução da produção de NO e aumento da inflamação vascular (Beckman *et al.*, 2002).

Figura 1 – Representação esquemática do metabolismo das lipoproteínas. A figura mostra o metabolismo dos lipídeos da dieta e endógenos com suas respectivas rotas de origem e destino, assim como das lipoproteínas que os transportam. Os quilomícrons e a VLDL têm papel importante no transporte de triglicerídeos, sendo eles exógenos e endógenos, respectivamente. A função da LDL é transportar o colesterol para os tecidos periféricos, mas eventualmente esse colesterol pode se depositar e acumular na parede interior das artérias, enquanto a HDL, por sua vez, faz o transporte reverso desse lipídeo para o fígado. O nome dos órgãos e tecidos estão escritos em preto e maiúsculo, dos lipídeos absorvidos ou transferidos em preto e minúsculo, das lipoproteínas em laranja, das enzimas em vermelho, dos lipídeos contidos no interior das lipoproteínas em roxo e processamentos bioquímicos

estão descritos em verde. As lipoproteínas estão representadas por círculos ou discos e as apolipoproteínas por quadrados, com seu respectivo nome no interior. Setas pretas indicam conversão de lipídeos em lipoproteínas ou em outros lipídeos e de lipoproteínas em outras lipoproteínas; setas em azul indicam absorção; vermelhas, ação enzimática; verdes, transferência de lipídeos; amarelas, captação de lipoproteínas e roxas, produção e secreção. Adaptado de Kwan *et al.* (2007) e Feingold & Grunfeld (2018).

2.1.3.3 O papel das citocinas, moléculas de adesão e oxLDL no contexto inflamatório da aterosclerose

Apesar da alta concentração plasmática de colesterol, especialmente de LDL, ser um dos principais fatores de risco para essa doença, o processo de aterogênese ainda engloba mecanismos além de acumulação de lipídeos como, por exemplo, a inflamação, que é uma resposta protetora do organismo para eliminar os agentes causadores de lesão tecidual e os detritos, bem como promover o reparo do local. A lesão inicial, chamada de estria gordurosa, envolve macrófagos derivados de monócitos e a infiltração de linfócitos T, um dos motivos que confere a esse processo um caráter inflamatório. Os sinais de inflamação acompanham o depósito de lipídeos e, dessa forma, ela participa dos mecanismos celulares e moleculares que contribuem para a aterogênese. Entretanto, o influxo de células inflamatórias costuma ser precedido pela deposição lipídica (Ross, 1999; Libby *et al.*, 2002a; Zhang, 2008).

No que tange à inflamação, um dos principais elementos envolvidos são as citocinas pró-inflamatórias. Essas moléculas modulam processos ateroscleróticos importantes, pois são fundamentais para a ativação e o subsequente recrutamento de células do sistema imune para o microambiente da lesão em resposta ao dano vascular, além de promover o crescimento, a proliferação e a migração de células do músculo liso, regular a diferenciação de células inflamatórias, estimular a expressão de moléculas de adesão e induzir a produção e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, participando, assim, da progressão da placa (Zeiffer *et al.*, 2004; Fatkhullina *et al.*, 2016). Citocinas como fator de necrose tumoral-alfa (*tumor necrosis factor-alpha*, TNF- α) (Branén *et al.*, 2004), proteína quimiotática de monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) (Gu *et al.*, 1998; Papadopoulou *et al.*, 2008), interleucina-1 beta (IL-1 β) (Moyer *et al.*, 1991; Kirii *et al.*, 2003; Merhi-Soussi *et al.*, 2005), interleucina-6 (IL-6) (Okazaki *et al.*, 2014) e interleucina-8 (IL-8) (Apostolopoulos *et al.*, 1996; Papadopoulou *et al.*, 2008) são exemplos de alguns desses mediadores de inflamação que são produzidos e liberados durante a aterogênese, principalmente pelas células endoteliais, de músculo liso e/ou por monócitos infiltrados no local (Doran *et al.*, 2008).

As citocinas quimiotáticas, também chamadas de quimiocinas, formam uma família de citocinas especializada no recrutamento e/ou ativação de leucócitos. Essas moléculas criam uma espécie de mecanismo de retroalimentação positiva na qual as células inflamatórias que recém chegaram no foco da lesão se tornam uma nova fonte para a produção de mais quimiocinas que, ativando os seus respectivos receptores, atraem ainda mais monócitos, neutrófilos e linfócitos que continuarão perpetuando o fenômeno (Bäck *et al.*, 2015).

Dentre os agentes inflamatórios, a IL-8, por exemplo, é uma quimiocina importante na aterosclerose devido ao seu envolvimento no recrutamento de leucócitos (Frostegard *et al.*, 1999; Ross, 1999; Libby, 2002b). Essa citocina está presente em grandes quantidades nas regiões da placa ricas em macrófagos. Além de agir como um peptídeo quimiotático que regula a migração de células inflamatórias como neutrófilos, linfócitos e basófilos (Apostolopoulos *et al.*, 1996), essa proteína modula positivamente a adesão de monócitos ao endotélio arterial (Papadopolou *et al.*, 2008) por aumentar a expressão de moléculas de adesão leucocitárias e endoteliais (Ross, 1999). Nos leucócitos isso acontece através do *shedding* de L-selectina com aumento simultâneo de integrinas $\beta 2$ (CD11b/CD18) que esse mediador induz na superfície dessas células (Arndt *et al.*, 1996; DiVietro *et al.*, 2001; Miotla *et al.*, 2001; Drost & MacNee, 2002). Seu potencial de quimioatração e ativação de neutrófilos confere à IL-8 associação com inflamação aguda (Apostolopoulos *et al.*, 1996; Papadopolou *et al.*, 2008). Vale ressaltar que, apesar de recrutar principalmente granulócitos, quando se refere à adesão leucocitária, essa interleucina também afeta subpopulações mononucleares como os monócitos (Smith *et al.*, 1991; Apostolakis *et al.*, 2009). A IL-8 é liberada por vários tipos celulares como monócitos/macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células epiteliais, endoteliais, mesoteliais e tumorais, em resposta a estímulos inflamatórios (Qazi *et al.*, 2011). A detecção dessa molécula em células de músculo liso vascular, tanto no próprio tecido da aorta torácica de ratos quanto em cultura indica que a IL-8 também é expressa nesse tipo celular. Além disso, o estímulo *in vitro* com Ang II aumenta sua expressão em células de músculo liso vascular (Kim *et al.*, 2008).

A IL-6, por sua vez, junto aos seus mensageiros de sinalização a jusante, contribui tanto para o desenvolvimento como para a desestabilização da placa (Okazaki *et al.*, 2014). A IL-6 é produzida em células de músculo liso (Libby, 2002b), mas também é liberada por monócitos ativados e induzida por uma variedade de estímulos em células T e B, células endoteliais, fibroblastos, células HeLA e células gliais. Estimula a diferenciação de células T e B, a secreção de imunoglobulinas, a proliferação de timócitos e a produção de proteínas de fase aguda de inflamação no fígado (Libermann & Baltimore, 1990), como a proteína C reativa (*C-reactive protein*, CRP) (Libby, 2002b). A CRP atua como importante marcador inflamatório assim como

a própria IL-6, que é uma molécula pró-inflamatória cujos níveis estão aumentados em resposta a trauma vascular (Libby *et al.*, 2002a). Deficiência de IL-6 prejudica o recrutamento de leucócitos, mostrando que essa molécula tem papel de suporte nesses processos (Romano *et al.*, 1997).

A IL-1 β apresenta várias funções que abrangem tanto recrutar leucócitos diretamente, como no caso dos macrófagos, quanto indiretamente, ao induzir a produção de mais citocinas e quimiocinas e estimular o aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, levando a uma maior migração de leucócitos. Assim como atua na quimiotaxia, a IL-1 β aumenta a permeabilidade vascular e medeia a aderência desses leucócitos no endotélio por estimular expressão de moléculas de adesão. Outras atribuições dessa citocina incluem modulações no metabolismo de LDL, regulação da mitogênese do músculo liso vascular, diminuição na contratilidade vascular, ação procoagulante e atividade coestimuladora para células T. A IL-1 β também contribui para o dano tecidual por estimular a proliferação celular e a síntese e liberação de metaloproteinases de matriz extracelular (*extracellular matrix metalloproteinases*, MMP) em macrófagos, células endoteliais e de músculo liso (Moyer *et al.*, 1991; Frostegard *et al.*, 1999; Libby, 2002b; Merhi-Soussi *et al.*, 2005; Rider *et al.*, 2011). A produção de IL-1 β ocorre principalmente em células do sistema imune inato, como monócitos e macrófagos, mas essa interleucina também é secretada por uma variedade de tipos celulares como, por exemplo, células endoteliais e musculares lisas vasculares (Moyer *et al.*, 1991; Lopez-Castejon & Brough, 2011; Alfaid *et al.*, 2015). O tamanho da lesão aterosclerótica também é influenciado pela presença dessa citocina (Kirii *et al.*, 2003).

A MCP-1 é responsável por atrair diretamente os monócitos para a íntima dos focos da lesão e contribuir na sua diferenciação em macrófagos (Libby *et al.*, 2002a). Além dos monócitos, células exterminadoras naturais (*natural killer*, NK) e linfócitos T são alvos da propriedade de quimioatração da MCP-1, que também tem papel na deposição de lipídeos (Gu *et al.*, 1998). Essa quimiocina estimula a adesão de monócitos ao endotélio vascular (Papadopoulos *et al.*, 2008) e o seu acúmulo no ateroma (Libby, 2002b). É produzida por células endoteliais, monocíticas, epiteliais, mesangiais, astrocíticas, microgliais, fibroblastos e músculo liso (Deshmane *et al.*, 2009). A produção de MCP-1 no músculo liso, células endoteliais, monócitos e macrófagos é normalmente uma resposta a citocinas inflamatórias como a IL-1 β , a interleucina-4 (IL-4), o TNF- α e o interferon gama (IFN- γ) (Kirii *et al.*, 2003). A deleção gênica da MCP-1 está relacionada à redução do tamanho da lesão aterosclerótica e a participação dessa citocina na aderência de monócitos nas monocamadas de endotélio vascular está implicada à expressão de E-selectina por essas células (Papadopoulos *et al.*, 2008).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por várias células, mas principalmente por macrófagos. Participa da resposta inflamatória, do balanço lipídico do sangue, estimula várias MMP e atua como citocina chave no recrutamento e ativação de leucócitos (Libby, 2002b; Branén *et al.*, 2004). Promove também ativação endotelial e aumento na permeabilidade vascular, estando, portanto, envolvido em praticamente todas as etapas da aterosclerose, desde seu início até sua regressão (Kempe *et al.*, 2005).

Além da atividade quimiotática mediada pelas citocinas presentes no microambiente da placa, a oxLDL por si só também estimula diretamente a quimiotaxia de monócitos circulantes para a região (Quinn *et al.*, 1987; Quinn *et al.*, 1988; Ross, 1993; Ross, 1999) e a expressão de moléculas de adesão (Takei *et al.*, 2001), quimiocinas (Papadopoulos *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2017) e citocinas (Liu *et al.*, 2014), reforçando assim o recrutamento de células inflamatórias. A lisofosfatidilcolina (LPC), gerada principalmente pela fosfolipase A₂ (PLA₂) na oxidação da LDL, é um dos lipídeos que possui propriedade quimiotática e exerce, assim, papel importante na aterosclerose (Quinn *et al.*, 1988). Os mecanismos dos efeitos supracitados nas expressões dos mediadores inflamatórios envolvem, por sua vez, uma regulação da expressão de genes de moléculas inflamatórias derivadas das células endoteliais e de músculo liso vascular (Ross, 1993; Libby, 2002b; Hansson & Libby, 2006; Sitia *et al.*, 2010; Bentzon *et al.*, 2014). Ademais, diferentemente do que acontece com as formas modificadas de LDL, os monócitos circulantes não apresentam resposta para a atividade quimiotática intrínseca de LDL nativas. Essa propriedade de quimioatração de monócitos exibida pela oxLDL reside na fração lipídica (Quinn *et al.*, 1987). A oxLDL inibe o movimento dos monócitos recrutados para a lesão aterosclerótica, que então se diferenciaram em macrófagos. A redução da mobilidade decorre da interação entre a oxLDL e o receptor CD36 dos macrófagos causando perda da polarização celular necessária para migração, sendo assim um mecanismo de aprisionamento de macrófagos nas lesões de aterosclerose (Quinn *et al.*, 1987; Park *et al.*, 2012; Park, 2014).

Como explicado anteriormente, moléculas de adesão leucocitárias e endoteliais estão sujeitas a alterações decorrentes da inflamação na aterosclerose. Em geral, o aumento na expressão dessas moléculas é induzido por citocinas. Nos leucócitos, as principais moléculas de adesão afetadas são as L-selectinas, integrinas e a PECAM-1, enquanto no endotélio as mais importantes incluem as E-selectinas, P-selectinas, a molécula de adesão intercelular-1 (*intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) e a molécula de adesão celular-vascular 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1). Essas mudanças, que em parte são promovidas por mediadores como a IL-8, não são provocadas apenas por citocinas, mas também podem ser induzidas por outros agentes de injúria vascular como, por exemplo, pela oxLDL. Entretanto,

vale ressaltar que em células vasculares, tanto nas endoteliais como nas musculares lisas, a oxLDL aumenta a expressão dessas moléculas independentemente (Ross, 1999; Libby 2002b; Hansson & Libby, 2006; Sitia *et al.*, 2010; Bentzon *et al.*, 2014), ao passo que, comparando com os leucócitos, a oxLDL induz uma significativa perda de L-selectina que acompanha o aumento das integrinas (Lehr *et al.*, 1995; Collins & Cybulsky *et al.*, 2001), da mesma forma que acontece pela ação da IL-8.

A transcrição de vários fatores e moléculas inflamatórias envolvidas na aterogênese é regulada pelo NF- κ B. A expressão de moléculas de adesão, tais como as presentes na superfície de leucócitos, e no endotélio, como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, é regulada por NF- κ B. As quimiocinas MCP-1 e IL-8 (Collins & Cybulsky *et al.*, 2001) e as citocinas IL-6 (Libermann & Baltimore, 1990), IL-1 β (Cogswell *et al.*, 1994) e TNF- α (Kempe *et al.*, 2005) são igualmente reguladas por NF- κ B. O NF- κ B também induz a expressão de moléculas de adesão indiretamente, por meio da ação indutora direta de algumas citocinas como IL-1 β e TNF- α que, para obterem níveis máximos de efeito, requerem a ativação desse fator de transcrição (Collins *et al.*, 1995). Nesse sentido, vale ressaltar que as citocinas IL-1 β e TNF- α , além de serem induzidas pelo NF- κ B, também são capazes de ativá-lo (Collins *et al.*, 1995; Albrecht *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2013). Partículas de lipoproteínas modificadas, assim como a IL-1 β e o TNF- α , tem participação igualmente semelhante na transcrição de genes para VCAM-1 e uma dessas vias é justamente dependente da ativação transcricional do NF- κ B (Libby, 2002b; Yurdagul *et al.*, 2016).

A disfunção endotelial não é apenas uma causa da inflamação, mas também uma consequência, considerando que a desregulação desse mecanismo, que a princípio deveria ser protetor na aterosclerose, leva à disfunção vascular. Processos inflamatórios aumentam a produção de EROs que levam à disfunção endotelial. Esse é o mecanismo pelo qual algumas destas citocinas, como o TNF- α , inibem a dilatação das arteríolas coronárias mediada por NO dependente de endotélio na doença arterial coronariana. Isso é consistente com os dados epidemiológicos que sugerem que inflamação crônica desencadeia disfunção endotelial e, por isso, doenças vasculares inflamatórias são associadas com disfunção endotelial persistente. (Galle *et al.*, 2003a; Tousoulis *et al.*, 2006; Zhang, 2008; Castellon & Bogdanova, 2016).

2.1.3.4 Efeitos da regulação anti-inflamatória na aterosclerose

As manifestações fisiopatológicas na aterosclerose abrangem, então, evolução com caráter inflamatório considerável. Contudo, existem certas citocinas e quimiocinas que, ao serem produzidas, agem como protetoras na aterosclerose, regulando negativamente a

inflamação. Algumas delas por si só já são especificamente anti-inflamatórias ou apresentam essa atividade apenas por seguir vias alternativas próprias que desencadeiam esse efeito benéfico. Isso atenua a formação da placa ou permite sua regressão. (Bäck *et al.*, 2015; Moss & Ramji, 2016).

A IL-4 foi citada anteriormente como indutora da síntese de MCP-1. Entretanto, essa citocina tem papel ambíguo na aterosclerose exercendo funções pró- ou antiaterogênicas. Esse efeito pode depender do estágio da doença. Em relação às suas propriedades anti-inflamatórias, a IL-4 induz a polarização para macrófagos M2 que, por sua vez, produz citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (Kleemann *et al.*, 2008; Ramji & Davies, 2015; Moss & Ramji, 2016). IL-4 é produzida por macrófagos, mastócitos e outras células. Esse mediador ainda leva a respostas imunes Th2 (relacionadas à produção de anticorpos IgE e reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos), inibindo a resposta Th1 (relacionadas à defesa mediada por fagocitose), e gerando efeitos benéficos tais como redução da ativação de macrófagos, da secreção do mediador pró-inflamatório IFN- γ e da expressão de atividade pró-coagulante por células endoteliais. A IL-4 também inibe as enzimas inflamatórias óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e COX-2, essa última em células inflamatórias e que a diferem da sua forma endotelial com função ateroprotetora. Em relação a seus efeitos pró-inflamatórios, além de estimular a produção de MCP-1, a IL-4 influencia a adesão celular por aumentar a expressão de VCAM-1 em células endoteliais e musculares lisas, aumentar a produção da enzima lipoxigenase, auxiliando na oxidação da LDL, e aumentar a expressão de receptor *scavenger* ligantes de oxLDL em macrófagos, aumentando a capacidade de captação de lipídeos modificados por essas células e acelerando a aterosclerose (Davenport & Tipping, 2003; Ramji & Davies, 2015).

A IL-10 inibe processos celulares que garantem a progressão e ruptura da placa e a trombose, incluindo a ativação do NF- κ B, produção de MMP, expressão de COX-2 e morte celular. Ademais, aumenta as concentrações sanguíneas de HDL, diminui a área superficial ocupada por macrófagos na lesão aterosclerótica e reduz a expressão de IFN- γ (Mallat *et al.*, 1999). Esse último efeito é resultado do balanço entre a interleucina-12 (IL-12) e a IL-10, ambas produzidas por monócitos e macrófagos de lesões ateroscleróticas e que influenciam a diferenciação de linfócitos T para fenótipos Th1 e Th2, respectivamente. A atividade anti-inflamatória da IL-10 facilita respostas Th2 e diminui a produção de IL-12 induzida por oxLDL, um elemento fundamental que induz seletivamente o padrão Th1 de citocinas das células T,

caracterizado pela síntese de IFN- γ e ativação de macrófagos e células T (Uyemura *et al.*, 1996, Lee *et al.*, 1999).

O TGF- β reduz a formação de células espumosas, evento decorrente da internalização de oxLDL por macrófagos e que será detalhado a frente. Nesse processo, essa citocina inibe a expressão de genes essenciais envolvidos na recaptação de lipoproteínas nas artérias e estimula expressão de genes envolvidos no efluxo de colesterol. Essa molécula ainda auxilia na estabilização da placa, por estimular a síntese de colágeno intersticial pelo músculo liso, e limita seu tamanho (Libby, 2002b; Ramji & Davies, 2015; Moss & Ramji, 2016)

Sendo assim, existem citocinas que auxiliam no desenvolvimento da placa (pró-aterogênicas) ou atenuam sua formação (anti-aterogênicas) (Moss & Ramji, 2016).

2.1.3.5 Mediadores alternativos da inflamação na aterosclerose

A fractalcina é uma proteína estruturalmente nova que possui um domínio semelhante a quimiocina solúvel e, estando fundida à membrana celular, se estende através dela até o citoplasma. É expressa em células endoteliais ativadas agindo como uma molécula de adesão, mas a clivagem próxima à junção do domínio transmembrana produz uma forma solúvel da fractalcina que, por sua vez, age como um forte fator quimiotático para monócitos e células T. Essa proteína também é expressa em músculo liso, mas não em macrófagos. A superexpressão do receptor de fractalcina favorece o crescimento da lesão aterosclerótica, enquanto sua ausência retarda o desenvolvimento da placa (Lesnik *et al.*, 2003).

A osteopontina (OPN) é uma sialoproteína específica de ossos e membro da família classificada como pequenas glicoproteínas dotadas de glicosilação N-ligada que atuam como ligantes de integrinas. Mesmo não sendo expressa em monócitos circulantes, essa molécula está presente em macrófagos, apresentando função chave nessas células envolvendo regulação da migração, sobrevivência e acúmulo tecidual. Ela é extremamente quimiotática para macrófagos e células T. Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , bem como partículas de oxLDL, interagem com a OPN permitindo que sua expressão aumente. A oxLDL induz aumento de OPN no músculo liso vascular, nas células endoteliais e em fibroblastos (Wolak, 2014).

A fisiopatologia da aterosclerose também envolve mediadores lipídicos. A fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) libera ácidos graxos poli-insaturados de fosfolipídeos de membrana. As duas isoformas da ciclooxigenase (COX), a ciclooxigenase 1 (COX-1) e a COX-2 catalisam a formação de prostaglandinas e tromboxanos a partir desses ácidos graxos, ou seja, do precursor ácido araquidônico (AA). Esses lipídeos também são metabolizados pelas lipoxigenases, gerando leucotrienos e lipoxinas. Os leucotrienos favorecem a hiperplasia da íntima e

progressão da aterosclerose por induzirem recrutamento e ativação de leucócitos, migração e proliferação das células musculares lisas e ativação e disfunção endotelial. Já as lipoxinas são responsáveis pelo balanço anti-inflamatório (Linton & Fazio, 2008; Ricciotti & FitzGerald, 2011; Bäck *et al.*, 2015; Kasikara *et al.*, 2018).

Algumas prostaglandinas específicas, por sua vez, ao ativarem seus receptores, também participam da resposta inflamatória na aterosclerose. Elas promovem processos como produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e MCP-1, participação em respostas imunes, recrutamento e migração de células inflamatórias para o sítio de injúria, além de modular o tônus vascular e a pressão arterial, induzir migração e proliferação das células musculares lisas, ativar MMP e, em fases mais avançadas do desenvolvimento da lesão, regular a adesão e agregação plaquetária e a formação do trombo (Das, 1982; Linton & Fazio, 2008; Ricciotti & FitzGerald, 2011; Kasikara *et al.*, 2018).

2.1.3.6 O estresse oxidativo na aterosclerose e a relevância da oxLDL nesse processo

Quando a produção de EROs supera a remoção destes radicais livres por sistemas enzimáticos ou não enzimáticos, o efeito dos danos teciduais oxidantes supera os benefícios antioxidantes e estabelece-se uma condição celular conhecida como estresse oxidativo. Essa condição torna o microambiente da placa propenso a danos celulares provocados pelo efeito oxidante deletério devido ao desequilíbrio na atividade redox. A maior parte dos agentes oxidantes são oriundos de moléculas de oxigênio, sendo também mais reativos. São chamados de EROs e incluem radicais livres como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($HO\cdot$) e peroxinitrito ($ONOO^-$) e moléculas não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$). O H_2O_2 é mais estável e difunde-se facilmente sendo convertido em $HO\cdot$ na presença de íons metálicos. O $ONOO^-$ é gerado pela reação entre NO e $O_2^{\cdot-}$. As fontes de EROs são a mitocôndria, isoformas da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) oxidase (NOX), xantina oxidase, COX, lipoxigenase, mieloperoxidase e eNOS desacoplada (Vogiatzi *et al.*, 2009; Kozina *et al.*, 2014; Nowak *et al.*, 2017). Níveis sustentados de EROs contribuem para a disfunção endotelial e participam da ativação de resposta inflamatória auxiliando, dessa forma, o desenvolvimento de aterosclerose. EROs derivadas de NOX apresentam papel na diferenciação de monócitos e na função de macrófagos, enquanto EROs mitocondriais de macrófagos promovem produção de MCP-1 (Nowak *et al.*, 2017). O H_2O_2 aumenta a fosforilação de tirosina cinases que culmina na maior ligação de leucócitos ao endotélio e em aumento de permeabilidade vascular. Essa molécula também leva a uma produção de fatores de transcrição como o NF- κ B (Vogiatzi *et al.*, 2009). Além disso, as

EROs também conduzem a uma acumulação nuclear desse fator de transcrição, pelo fato dele ser regulado pelo estado redox das células (Collins & Cybulsky *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo não é, portanto, somente uma consequência, mas também um dos fatores que contribuem para a fisiopatologia da disfunção endotelial e, conseqüentemente, da aterosclerose (Davignon & Ganz, 2004; Kozina *et al.*, 2014; Föstermann *et al.*, 2017). Além da relação de causa e efeito entre o estresse oxidativo e a disfunção endotelial, essa via de mão-dupla também existe entre esse evento e a inflamação. As EROs induzem o NF- κ B que, uma vez ativado, estimula a produção de TNF- α , cuja sinalização também tem papel chave na geração de mais EROs (Zhang, 2008).

Isoformas da NOX contribuem para a modulação de vários eventos na aterogênese. A NAD(P)H oxidase 1 (NOX1) é expressa principalmente no músculo liso; a NAD(P)H oxidase 2 (NOX2), em células endoteliais, fibroblastos da adventícia e células imunes; a NAD(P)H oxidase 4 (NOX4) é ubíqua em células vasculares e a NAD(P)H oxidase 5 (NOX5) é encontrada em células endoteliais (Sheehan *et al.*, 2011). As isoformas 1, 2 e 5 geram predominantemente $O_2^{\cdot-}$, em contraste com a isoforma 4, que gera H_2O_2 (Sirker *et al.*, 2011).

A NOX1 é importante para a ativação, proliferação e migração de células musculares lisas. Deficiência de NOX1 reduz o tamanho da lesão, bem como o conteúdo de macrófagos. A ausência de NOX1 não diminui crescimento intimal e a formação da neoíntima, mas reduz a proliferação celular e aumenta o conteúdo de colágeno, auxiliando na estabilização das lesões ateroscleróticas (Sheehan *et al.*, 2011).

A NOX2 favorece a disfunção endotelial e a aterosclerose, estando aumentada nessa doença. Na parede arterial ela induz vasoconstrição por inibição de atividade e biossíntese de NO, estimula o aumento de moléculas quimioatraentes e de adesão, favorece a ativação e agregação plaquetária e facilita a superprodução de isoprostanos, compostos semelhantes a prostaglandinas. A ausência da subunidade gp91^{phox} da NOX2 provoca queda dos níveis de $O_2^{\cdot-}$ e aumenta a biodisponibilidade de NO, atenuando a formação de placas ateroscleróticas. A deficiência da subunidade p47^{phox} igualmente contribui para a redução das lesões (Violi *et al.*, 2017).

A enzima produtora de H_2O_2 , NOX4, apresenta efeitos pró- e anti-aterogênicos. Sua deficiência aumenta o desenvolvimento da placa, induz vias pró-aterogênicas e aumenta a expressão de citocinas e moléculas de adesão com subsequente adesão leucocitária e acúmulo de macrófagos (Schürmann *et al.*, 2015). Entretanto, NOX4 também contribui para fenótipos de músculo liso associados à instabilidade de placa (Xu *et al.*, 2014).

Não há muitos dados na literatura sobre a recém-descoberta NOX5, mas já se sabe que ela está aumentada nas artérias coronárias de pacientes com doença arterial coronariana (Guzik *et al.*, 2008)

A oxLDL é formada a partir de estresse oxidativo e tem a propriedade de desencadear a geração de mais EROs vasculares, criando um ciclo vicioso. A oxidação da lipoproteína, por exemplo, gera intermediários mais ou menos estáveis como a LPC, produtos de peroxidação lipídica (Galle *et al.*, 2006), alguns fosfolípidos oxidados e aldeídos de cadeia curta (Libby, 2002b). A oxLDL libera $O_2^{\cdot-}$ diretamente, pois os radicais lipídicos peroxidados liberam tanto essa molécula quanto sua forma protonada, o radical hidroperoxil ($HO_2^{\cdot}$). Há também formação de $O_2^{\cdot-}$ induzida por oxLDL que ocorre por ativação da NOX, alvo da LPC. Esse radical também é gerado por desacoplamento da eNOS ou ativação do receptor de oxLDL do tipo lectina (LOX-1) por ação da oxLDL (Galle *et al.*, 2006).

2.1.3.7 Controle do estresse oxidativo na aterosclerose

O equilíbrio redox é mantido pela ação de fatores antioxidantes. As enzimas superóxido dismutase (SOD), por exemplo, são uma defesa contra os efeitos do $O_2^{\cdot-}$. Quimicamente, a SOD acelera a reação entre duas moléculas de $O_2^{\cdot-}$ formando H_2O_2 e oxigênio molecular. As isoformas dessa enzima são a superóxido dismutase 1 (SOD1), ou SOD dependente de cobre e zinco (CuZn-SOD) e que está presente no citoplasma; a superóxido dismutase 2 (SOD2) que, por sua vez, é uma SOD dependente de manganês (Mn-SOD) e encontra-se na matriz mitocondrial; e a SOD extracelular (Sentman *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2018). Em um modelo experimental animal, a deficiência de SOD2 aumentou os níveis de EROs mitocondriais e vasculares com dano ao ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, DNA) e o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas avançadas e extensivas, com característica de vulnerabilidade (Vendrov *et al.*, 2017). A SOD extracelular, por sua vez, mostrou pouca eficiência protetora na aterogênese (Sentman *et al.*, 2001), indicando que radicais mitocondriais, mas não o $O_2^{\cdot-}$ extracelular, tem influência significativa na aterosclerose.

A catalase, por sua vez, responsável por converter H_2O_2 em água, apresenta envolvimento importante no retardamento da aterosclerose. Esse efeito foi demonstrado pela redução de isoprostanos F_2 no plasma em modelo de superexpressão de catalase e também pelo fato de que a isoforma citosólica da SOD, SOD1, sozinha não é suficiente para gerar esses efeitos benéficos na aterosclerose, precisando atuar em conjunto com a catalase. Isso mostra que somente a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ não é tão eficaz para promover efeito protetor, pois o H_2O_2

também participa da fisiopatologia e, portanto, precisa ser consumido de forma que não siga pela rota de geração de espécies radicalares (Yang *et al.*, 2004).

O balanço antioxidante também é promovido pela glutathiona reduzida (GSH), um antioxidante endógeno. Roedores com deficiência na enzima que sintetiza a GSH apresentaram placas com desenvolvimento mais rápido e que se tornaram maiores e mais complexas. Essas placas também tinham, em maior frequência, capas fibrosas finas, núcleos necróticos grandes, fendas, hemorragia intraplaca e mais células ricas em colesterol internalizado, as chamadas células espumosas (Callegari *et al.*, 2011).

A tioredoxina-1 (Trx-1) é uma pequena proteína de 12 kDa crucial no sistema de proteção contra estresse oxidativo. O interior celular se mantém reduzido por oxidação reversível da Trx-1 pelos resíduos de cisteína com atividade redox, os resíduos 32 e 35, formando uma ligação dissulfeto. A Trx-1 volta ao seu estado reduzido pela ação da tioredoxina redutase. Outro mecanismo é a redução da tioredoxina peroxidase pela Trx-1 e, quando reduzida, essa enzima sequestra EROs. A Trx-1 atenua os marcadores M1 pertencentes a macrófagos pró-inflamatórios e induz os marcadores anti-inflamatórios M2. Além disso, essa molécula reduz o número de macrófagos na lesão aterosclerótica e diminui seu tamanho (El Hadri *et al.*, 2012).

2.1.3.8 Mecanismos paralelos de lesão tecidual e demais alterações mediadas por oxLDL e seus lipídeos derivados

Além dos efeitos inflamatórios e pró-oxidativos, as partículas de oxLDL apresentam outros mecanismos particulares de lesão celular.

No processo de aterosclerose, a íntima sofre estreitamento e a neoíntima é formada. As células musculares lisas vasculares são cruciais nesse processo. A proliferação e migração de células musculares lisas para a íntima do vaso aterosclerótico são contribuintes importantes para esse estreitamento. A regulação do ciclo celular é fundamental nessa proliferação (Dzau *et al.*, 2002; Vukovic *et al.*, 2006; Lyon *et al.*, 2016). Essas lesões também podem acumular detritos celulares remanescentes citotóxicos e padrões moleculares associados a danos (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs), contribuindo para o ambiente inflamatório e instabilidade da placa. Além do mais, necrose celular, que a nível tecidual se refere à acúmulo de detritos celulares, pode ser resultado de apoptose, uma espécie de morte celular programada em que inicialmente a membrana celular está intacta e as organelas condensadas (Seimon & Tabas, 2009; Rayner, 2017). Nesse contexto, $O_2^{\cdot-}$ derivado da oxLDL leva a proliferação, hipertrofia, apoptose ou necrose celular, dependendo da quantidade e duração da exposição. O

$O_2^{\cdot-}$ tem papel ambíguo no ciclo celular podendo levar à morte ou crescimento celular. Proliferação e apoptose são pontos finais desse ciclo e ambos são deletérios no processo aterosclerótico, enquanto que a hipertrofia também é um desbalanço decorrente de atrasos em fases específicas do ciclo celular. Esse efeito está associado à indução de expressão de proteínas supressoras e principalmente de proteínas ativadoras. A célula muscular lisa vascular, célula endotelial, macrófagos e fibroblastos são tipicamente alvos dessa resposta proliferativa (Zettler *et al.*, 2003; Galle *et al.*, 2006). Em células endoteliais, a LPC, lipídeo derivado da oxLDL, também induz atrasos no ciclo celular e apoptose. Esses efeitos são acompanhados por secreção de IL-8 e produção de EROs (Chang *et al.*, 2017).

A LPC diminui a biodisponibilidade de NO em células endoteliais por desacoplar a eNOS e gerar EROs. Entretanto, a LPC não afeta a produção de NO, uma vez que não há alteração na taxa de conversão de L-arginina a L-citrulina, e não interfere com a atividade da eNOS, avaliada pelo nível de fosforilação tanto do sítio de ativação correspondente ao resíduo de serina 1177 como do sítio de inativação equivalente ao resíduo de treonina 495. A redução da biodisponibilidade de NO é acompanhada de prejuízo na função vascular determinada por diminuição do relaxamento dependente de endotélio induzido por acetilcolina (*acetylcholine*, ACh) (Kozina *et al.*, 2014).

Hipercolesterolemia prejudica a função vasomotora (Raman *et al.*, 2011). Exposição à oxLDL reduz tanto o tônus contrátil quanto respostas de vasodilatação (Napoli *et al.*, 1997). No entanto, oxLDL potencializa a ação de agentes vasoconstritores como a Ang II, o que pode contribuir para os vasoespasmos das artérias ateroscleróticas (Galle *et al.*, 2003b). Tal efeito pode decorrer da ativação da célula muscular lisa e da inativação do NO por $O_2^{\cdot-}$ induzido por oxLDL, numa reação que forma $ONOO^{\cdot-}$ (Galle *et al.*, 2006; Kozina *et al.*, 2014).

2.1.3.9 Componentes celulares, estruturais e moleculares da placa aterosclerótica

Vários subtipos celulares estão presentes na lesão aterosclerótica, principalmente células da parede vascular, incluindo as endoteliais e de músculo liso, e células do sistema imune, englobando macrófagos derivados de monócitos e células T, mas até mesmo neutrófilos, células NK, alguns subtipos de células B e mastócitos estão envolvidos. Quanto às células inflamatórias, os monócitos e linfócitos T estão presentes em todos estágios da doença, enquanto que os granulócitos são raros em quaisquer fases da aterogênese. Mas, um marco clássico e importante da fisiopatologia da aterosclerose é a internalização da oxLDL, comumente por macrófagos, formando assim as células espumosas, cujo nome é derivado de seu aspecto sob visualização em microscópio (Ross, 1993; Ross, 1999; Libby *et al.*, 2002a;

Libby, 2002b; Kirii *et al.*, 2003; Hansson & Libby, 2006; Sitia *et al.*, 2010; Bentzon *et al.*, 2014; Jaipersad *et al.*, 2014; Ramji & Davies, 2015; Moss & Ramji, 2016; Chistiakov *et al.*, 2017). A captação da oxLDL pelos macrófagos é feita por receptores *scavenger*, como receptor *scavenger* classe A tipo 1 (SR-A1), SR-B1, CD36, macrosialina/CD68 e LOX-1 (Kirii *et al.*, 2003; Chistiakov *et al.*, 2017). A IL-6, o IFN- γ e o TNF- α são exemplos de citocinas que promovem a formação de células espumosas. O músculo liso também expressa receptores *scavenger*, podendo internalizar LDL modificada para formação dessas células (Kirii *et al.*, 2003; Sitia *et al.*, 2010; Ramji & Davies, 2015; Moss & Ramji, 2016). A oxLDL gera efeitos deletérios tanto quando está livre na íntima, como já foi descrito, quanto ao estar internalizada formando as células espumosas, que contribuem para a secreção de mais mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas e EROs, e promovem remodelamento estimulando a migração de células musculares lisas (Libby, 2002b; Sitia *et al.*, 2010; Jaipersad *et al.*, 2014).

Com o progresso da inflamação descrita acima, as células do sistema imune recrutadas para o sítio aterogênico começam a produzir enzimas proteolíticas, particularmente como as MMP, dentre outras enzimas hidrolíticas. O aumento da expressão e da atividade dessas enzimas induz dano celular e necrose local. Esse fenômeno é acompanhado por resposta inflamatória que, além de ativar a diferenciação de células musculares lisas vasculares através da troca fenotípica de um perfil contrátil para um proliferativo e sintético, também estimula a migração e a proliferação dessas células. Posteriormente, estas células participarão da formação de uma matriz extracelular responsável por criar uma capa de tecido fibroso que envolve o núcleo lipídico e necrótico através de um processo que será detalhado adiante. A migração e a proliferação também conduzem a espessamento da parede da artéria que é compensado com dilatação gradual de forma que a área luminal normalmente permanece inalterada. Este evento compensatório, chamado remodelamento, é efetivo para manter a área do lúmen desde que não haja comprometimento significativo gerado por uma placa suficientemente grande ou que oclua a luz do vaso (Ross, 1999; Dzau *et al.*, 2002; Libby, 2002b; Vukovic *et al.*, 2006; Rudijanto, 2007; Bentzon *et al.*, 2014; Vacek *et al.*, 2015; Bennett *et al.*, 2016; Hasanov *et al.*, 2017).

As principais MMP envolvidas na aterosclerose são principalmente as dos tipos 2 e 9, mas também as dos tipos 1, 3, 8 e 13 estão incluídas, dentre outras enzimas proteolíticas. Elas degradam a camada de tecido conjuntivo da matriz extracelular, formada por colágeno, proteoglicanos e elastina, e que faz a separação entre as camadas íntima e média. Isso permite que células musculares lisas migrem da camada média para a íntima, formando a chamada neoíntima. Vale ressaltar que o tecido extracelular da íntima arterial normal ou do estreitamento intimal adaptativo perde gradativamente o componente fibrocelular em substituição por tecido

fibroso rico em colágeno. A MMP do tipo 10, por outro lado, é benéfica tendo papel fibrinolítico por atacar a molécula de fibrinogênio, impedindo dessa forma a conversão em fibrina (Libby, 2002b; Rudijanto, 2007; Bentzon *et al.*, 2014; Vacek *et al.*, 2015).

Nessas circunstâncias de criação da neoíntima, como já foi dito, o músculo liso apresenta fenótipo mais proliferativo e sintético (Rudijanto, 2007). Nesse caso, em função da diferenciação celular, seria esperado aumento da vasodilatação em detrimento da vasoconstrição, mesmo que os mecanismos vasodilatadores estejam comprometidos na aterosclerose (Bonthu *et al.*, 1997). No entanto, o músculo liso em seu estado quiescente contrátil regula o diâmetro dos vasos por processos de contração e dilatação, explicando porque a perda do fenótipo contrátil não melhora necessariamente a capacidade relaxante do vaso (Rudijanto, 2007). Mas, é bastante provável que o prejuízo no relaxamento vascular e predisposição a vasoespasmos também seja consequência da atenuação promovida pela aterosclerose na dilatação mediada por endotélio principalmente (Förstermann *et al.*, 1988). A disfunção endotelial e seus eventos associados, como por exemplo, a diminuição de NO, estresse oxidativo e o excesso de LDL prejudicam a vasodilatação (Davignon & Ganz, 2004).

O músculo liso no seu perfil proliferativo e sintético assume, portanto, um papel importante na formação da neoíntima. Além de proliferação e migração, a mudança de fenótipo garante a essas células a habilidade de secretar citocinas e proteínas de matriz extracelular. A hipertrofia bem como o aumento do número de células, ou hiperplasia, contribui para a progressão da lesão. Por outro lado, essas células também auxiliam na estabilização da placa e previnem sua ruptura, por meio da síntese e deposição de matriz de tecido conectivo extracelular para formar uma capa fibrosa que envolve as células espumosas ricas em colesterol, os lipídeos extracelulares e os detritos celulares necróticos. Entretanto, isso resulta em remodelamento vascular, estreitamento da passagem luminal e fluxo sanguíneo anormal (Dzau *et al.*, 2002; Vukovic *et al.*, 2006; Bennet *et al.*, 2016; Nowak *et al.*, 2017).

A evolução do processo faz com que novos vasos sejam formados intraplaca a partir dos *vasa vasorum* da adventícia. Eles são frágeis e crescem na base da placa servindo como via alternativa para a entrada de monócitos e outras células do sistema imunológico e funcionando como fonte nutritiva para o crescimento da placa. Eles podem causar sangramentos intraplaca que aumentam o núcleo necrótico e a inflamação (Libby, 2002b; Bentzon *et al.*, 2014).

A ruptura da placa é causada por inúmeros eventos. A erosão superficial da placa com consequente denudação do endotélio pode ser provocada pela ação local de mediadores inflamatórios ou de células T citotóxicas levando à morte celular por apoptose. Os linfócitos T também produzem IFN- γ que impede a proliferação de células musculares lisas vasculares e a

síntese de colágeno. Outro possível mecanismo envolve a combinação desses mediadores com a atividade de enzimas proteolíticas secretadas pelos macrófagos espumosos, tais como os ativadores de plasminogênio, catepsinas e as MMP, que degradam componentes subendoteliais e a matriz rica em colágeno que forma a capa fibrosa. A partir do rompimento dos microvasos, combinado à perda de células endoteliais e musculares lisas vasculares por apoptose e necrose e somado à ruptura da capa de colágeno, tem-se a exposição ao sangue circulante de conteúdos trombogênicos do núcleo da placa, como o colágeno subendotelial e o fator de von Willebrand, disparando a ativação das plaquetas e a subsequente agregação plaquetária. A desestabilização e a ruptura da placa ocorrem por um defeito estrutural da cápsula fibrosa causado por uma possível lacuna. Essa é a principal causa de formação de trombos, podendo estar associado ou não a um vasoespasma, e tem como consequência os eventos isquêmicos agudos que levam ao IM e/ou AVE (Libby, 2002b; Vukovic *et al.*, 2006; Bentzon *et al.*, 2014; Bennett *et al.*, 2016).

Nesse contexto, pacientes vulneráveis são definidos como aqueles que possuem alta predisposição a curto prazo de sofrerem eventos cardiovasculares clínicos agudos, incluindo risco de morte súbita por evento cardíaco ou cerebrovascular decorrente de processo tromboembólico. No que tange a aterosclerose, um fenótipo de placa vulnerável é um importante fator de risco. Placas vulneráveis ou instáveis se caracterizam como aquelas de tamanho largo com alto risco de trombose por erosão ou ruptura. Normalmente contém um grande núcleo necrótico e com alto teor lipídico, são ricas em LDL, apresentam descamação endotelial com agregação plaquetária superficial, poucas células musculares lisas vasculares e com alta taxa de apoptose, são pobres em colágeno formando uma capa fibrosa delgada, desarranjo e degradação do colágeno intersticial, inflamação intensa decorrente de muitas células inflamatórias e com predominância de macrófagos, processo inflamatório perivascular/adventicial, padrão irregular de calcificação, grande densidade de microvasos intraplaca por neovascularização a partir dos *vasa vasorum* e com hemorragias mais abundantes e frequentes. Por outro lado, placas estáveis estão associadas a área do lúmen preservada, possuem pouco depósito lipídico, camada de colágeno espessa, são ricas em triglicerídeos ao invés de LDL, apresentam poucas células inflamatórias e com prevalência de envolvimento secundário de granulócitos, principalmente como os neutrófilos, e em detrimento à maior presença de macrófagos (Libby, 2002b; Libby & Aikawa, 2002c; Naghavi *et al.*, 2003; Vancraeynest *et al.*, 2011; Bentzon *et al.*, 2014; Libby & Pasterkamp, 2015).

Figura 2 – Elementos da formação e progressão da placa aterosclerótica. O desenvolvimento das lesões ateroscleróticas envolve disfunção endotelial, depósito de gordura, inflamação, apoptose, degradação proteolítica de matriz extracelular, proliferação e migração de células, angiogênese, adesão plaquetária, dentre outros. Adaptado de Sanz & Fayad (2008).

2.1.4 Abordagens terapêuticas atuais e futuras no manejo da aterosclerose

O colesterol é um importante componente estrutural da membrana celular e controla a fluidez da membrana. Essa substância é essencial para a formação das balsas lipídicas que são necessárias para sinalização celular, direcionamento e transporte de proteínas e apoptose. Serve como precursor da vitamina D e de hormônios esteroides incluindo estrógeno, progesterona e testosterona. Por não poder ser quebrado, esse composto não desempenha papel nutricional caracterizado pelo seu consumo com produção de energia, diferente da bioquímica dos triglicerídeos e dos ácidos graxos livres, importantes na geração de energia por β -oxidação. Logo, esses últimos têm uma característica mais relacionada com a nutrição (Houten & Wanders, 2010; Lecerf & Lorgeril 2011; Soliman, 2018). Há duas fontes de colesterol: o endógeno e o exógeno. O exógeno é proveniente de alimentos e exclusivamente de derivados animais. O endógeno é sintetizado por todas as células e tecidos, mas principalmente pelo fígado, intestino e órgãos reprodutivos. Se o colesterol da dieta tem sua absorção aumentada, a síntese endógena diminui e vice-versa, em um mecanismo para manter a homeostase do colesterol constante. A maior parte do colesterol, cerca de 70%, é advindo da síntese endógena

e apenas um terço vem da dieta, que pouco contribui para o colesterol plasmático (Harman *et al.*, 2008; Lecerf & Lorgeril 2011; Kapourchali *et al.*, 2016; Soliman, 2018).

Neste sentido, uma das principais classes de fármacos que atuam no controle do colesterol são as estatinas. As estatinas atuam no fígado inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG CoA) redutase, enzima limitante na taxa de síntese de colesterol que converte a HMG CoA em ácido mevalônico/mevalonato, precursor do colesterol. Esses fármacos agem competindo com o substrato normal da enzima. A diminuição da síntese endógena de colesterol leva o fígado a aumentar a expressão de genes para receptores de LDL para a captação de colesterol presente nessas lipoproteínas. Isso reduz então a concentração plasmática de LDL e também de triglicerídeos. Sendo assim, o mecanismo principal e direto das estatinas é a redução da concentração de colesterol e lipoproteínas que são aterogênicas. Alguns fármacos incluídos nessa classe são a sinvastatina, lovastatina, pravastatina, fluvastatina, cerivastatina e atorvastatina (Stancu & Sima, 2001; Moss & Ramji, 2016).

As estatinas também apresentam efeitos pleiotrópicos. Elas possuem também ações anti-inflamatórias. O uso de pravastatina reduz o índice de eventos coronarianos em pacientes com inflamação elevada, determinada por níveis aumentados de amiloide sérica A e CRP (März & Wieland, 2000). O uso de estatinas também diminui os níveis de CRP, mas não altera as concentrações das citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α (Lyngdoh *et al.*, 2011). A atorvastatina reduz o número de macrófagos intimaes, MCP-1 e a ativação do NF- κ B. As estatinas também diminuem o recrutamento de leucócitos estimulado por um mediador lipídico (Stancu & Sima, 2001). Ademais, as estatinas melhoram a função endotelial com aumento na liberação de NO, inibem a atividade de MMP e diminuem a proliferação de células musculares lisas, a geração de EROs induzidas por Ang II via NOX e a agregação plaquetária (Stancu & Sima, 2001; Rosenson, 2004).

Outra classe de fármacos são os derivados do ácido fibríco, os fibratos, que incluem o clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, ciprofibrato e bezafibrato. Estruturalmente se assemelham a ácidos graxos de cadeia curta e se ligam ao receptor alfa ativado pelo proliferador peroxissômico (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*, PPAR- α). Esse é um receptor nuclear que uma vez ativado desloca-se como um complexo para o núcleo e, se ligando ao DNA em regiões promotoras específicas, regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, na captação de ácidos graxos e β -oxidação. Esses fármacos reduzem especialmente a concentração sérica de triglicerídeos, mas também elevam os níveis de HDL, com efeitos variáveis nos níveis de LDL. Os fibratos reduzem a síntese de triglicerídeos e de VLDL no fígado. No plasma, essa diminuição dos triglicerídeos está relacionada ao aumento

induzido pela ativação do PPAR- α na expressão de LPL, responsável pela lipólise de triglicerídeos dos quilomícrons e de partículas de VLDL, bem como pela diminuição da expressão de apolipoproteína C-III que, além de inibir a LPL, também compete com a apolipoproteína E por espaço na superfície das lipoproteínas. O aumento de HDL deve-se ao aumento da transcrição de apolipoproteínas A-I e A-II, suas componentes de relativa importância. Os fibratos apresentam efeitos pleiotrópicos que também são úteis no manejo da aterosclerose e incluem efeitos anti-inflamatórios como inibição do NF- κ B e de COX-2, da expressão estimulada por TNF- α de VCAM-1 e da produção mediada por IL-1 β de IL-6, assim como diminuição do recrutamento e adesão de células mononucleares ao endotélio vascular. Por fim, os fibratos reduzem a lesão aterosclerótica e também diminuem o risco de doença arterial coronariana e AVE (Staels *et al.*, 1998; Watts & Dimmitt, 1999; Lee *et al.*, 2003; Fazio & Linton, 2004; Steiner, 2005; Inaba *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011).

Os esteróis e estanois vegetais são obtidos na alimentação pela ingestão de verduras, legumes, frutas e cereais específicos e inibem a absorção de colesterol ao impedir a sua solubilização intraluminal, sendo incorporados no lugar do colesterol nas micelas formadas no trato digestório. São protetores da iniciação e progresso da aterosclerose. Essas substâncias, além de reduzir a concentração plasmática de colesterol associado a LDL, também exibem efeitos anti-inflamatórios, como observado pela diminuição da produção de prostaglandinas em macrófagos ativados *in vitro* e ainda estimula vias antioxidantes (Gylling *et al.*, 2014).

A ezetimiba, por sua vez, também inibe a absorção de colesterol, mas por bloquear a proteína C1-símile de Niemann-Pick 1 (*Niemann-Pick C1-like 1 protein*, NPC1L1), proteína transmembrana localizada na membrana apical dos enterócitos. A NPC1L1 é um transportador que media a absorção intestinal de colesterol. Com sua função bloqueada, o metabolismo de lipídeos é alterado por um efeito duplo. Inicialmente, o colesterol exógeno da dieta tem sua absorção reduzida. Por compensação, a produção de colesterol endógeno aumenta e quantidades adicionais necessárias são supridas através da captação desse lipídeo pelo fígado vindo de LDL, cuja concentração no plasma diminui. Esse fármaco também diminui a concentração de citocinas inflamatórias circulantes, como a MCP-1 e o TNF- α , e reduz o acúmulo de macrófagos na lesão (Ladeiras-Lopes *et al.*, 2015; Tie *et al.*, 2015). A ezetimiba também se mostrou eficaz em reduzir placas ateroscleróticas em carótidas (Bogiatzi & Spence, 2012).

A aspirina é um fármaco que inibe a enzima COX por acetilação irreversível, impedindo que o AA alcance seu sítio catalítico. Isso diminui a produção de PGH₂, precursora do tromboxano A₂ (TXA₂). Nas plaquetas esse efeito é definitivo, por não poderem renovar a

expressão de COX. Além disso, nas plaquetas a isoforma expressa é a COX-1, submetida à acetilação por aspirina bem mais rapidamente que a COX-2. Acredita-se que esse fármaco também acetila o fibrinogênio. Esses efeitos reduzem a agregação plaquetária e promovem fibrinólise, sendo então antitrombóticos. Em relação aos desfechos cardiovasculares da aterosclerose, como IM e AVE, o uso da aspirina como prevenção primária não tem eficácia clínica bem definida, enquanto que para prevenção secundária, os benefícios são claros (Dai & Ge, 2012; Ittaman *et al.*, 2014; Mekaj *et al.*, 2015).

A niacina ou ácido nicotínico é um fármaco que age em um receptor específico acoplado a proteína G_i nos adipócitos. A inibição da adenilato ciclase diminui a atividade da lipase sensível a hormônio dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Isso reduz a hidrólise dos triglicerídeos em ácidos graxos livres. Esse evento limita o fluxo de ácidos graxos ao fígado e, conseqüentemente, a disponibilidade de ácidos graxos para compor os triglicerídeos a serem incorporados na VLDL, decaindo então a biossíntese dessa lipoproteína. Níveis plasmáticos diminuídos de VLDL refletem em concentração sérica reduzida de LDL e decréscimo do depósito de colesterol. No fígado, ao diminuir a atividade exercida pelo receptor de catabolismo de HDL, a niacina reduz a depuração de apolipoproteína A-I. Isso otimiza a remoção de colesterol por transporte reverso. A niacina também diminui produção de EROs induzida por Ang II, oxidação da LDL, expressão de VCAM-1 e de quimiocinas como a fractalcina induzida por TNF- α , expressão gênica de MCP-1, os níveis de CRP e a adesão de monócitos a células endoteliais mediada por TNF- α ou oxLDL. Esses efeitos atenuam a aterogênese (Kamanna & Kashyap, 2008; Ruparelia *et al.*, 2011). A niacina reduz a reincidência de IM não fatal, bem como diminui a taxa de AVE (Tavintharan & Kashyap, 2001; Ruparelia *et al.*, 2011).

Sequestradores de sais/ácidos biliares são grandes polímeros que se ligam a sais/ácidos biliares no intestino para impedir sua reabsorção. A depleção de sais biliares estimula o metabolismo hepático para a síntese de sais biliares através de aumento da atividade da enzima 7 α -hidroxilase, enzima limitante na taxa de síntese dessa substância. Devido à elevação do consumo de colesterol, o fígado aumenta a expressão de receptores de LDL para captação desse lipídeo vindo dessas lipoproteínas, reduzindo assim o nível sérico de colesterol. Algumas resinas dessa classe são a colestiramina, o colesvelam e o colestipol (Einnarson *et al.*, 1991; Chiang, 2004; Chiang, 2013; Ross *et al.*, 2015). Os sequestradores de sais biliares mostram-se eficazes na regressão de placas ateroscleróticas (DePalma *et al.*, 1979) e têm efeito protetor na doença arterial coronariana. Mas, ao contrário das estatinas em monoterapia, esses fármacos são úteis somente como terapia de segunda linha (Ross *et al.*, 2015).

Novos alvos e fármacos no tratamento da aterosclerose estão em estudo. A proproteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*, PCSK9) é uma serina protease componente da LDL que ao ligar ao receptor de LDL, promove sua internalização, degradação intracelular e previne sua reciclagem, diminuindo a captação de LDL. Essa molécula também é induzida por inflamação. Em pesquisas pré-clínicas, as estratégias promissoras que têm como alvo essa proteína são os anticorpos monoclonais. Os anticorpos anti-PCSK9 que representam essa classe de drogas são evolocumabe, alirocumabe e bococizumabe. A proteína de transferência de triglicerídeos microssomal (*microsomal triglyceride transfer protein*, MTTP) é necessária na montagem dos quilomícrons e de VLDL nos enterócitos e hepatócitos, respectivamente. Defeitos na atividade dessa molécula refletem em níveis extremamente baixos de quilomícrons, VLDL, IDL e LDL. Isso sugere que a inibição da MTTP seria uma abordagem interessante. O lomitapide é um inibidor de MTTP que está em estudos clínicos de fase III. Os oligonucleotídeos antisense (*antisense oligonucleotides*, ASO) são ácidos nucléicos de fita única formados por sequências curtas de aproximadamente 20 nucleotídeos que se ligam a sequências complementares do ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*, RNA) mensageiro (RNAm). O mipomersen é uma droga da classe dos ASO que bloqueia a síntese hepática de apolipoproteína B-100, componente de lipoproteínas aterogênicas. Outras drogas em potencial incluem: RVX-208, um estimulador da síntese de apolipoproteína A-I, componente da HDL; darapladib, um inibidor de PLA₂ associado à lipoproteína; varespladib, um inibidor da forma secretória da PLA₂ e; canakinumabe, um anticorpo monoclonal anti-IL-1β (Ladeiras-Lopes *et al.*, 2015; Moss & Ramji, 2016; Tang & Hazen, 2017).

2.2 O-GlcNAc

2.2.1 Uma visão geral das modificações pós-traducionais

As modificações pós-traducionais correspondem à adição reversível de um grupamento químico a proteínas traduzidas. Esse processo regula a atividade, interação, localização, estabilidade, tráfego, agregação e outras atribuições das proteínas modificadas (Lima *et al.*, 2012; Duan & Walther, 2015; Audagnotto & Dal Peraro, 2017). Alguns exemplos incluem: *acetilação*, uma modalidade de acilação em que um grupo acetil (-COCH₃) é adicionado a grupamentos amino N-terminais de polipeptídeos ou nessas regiões amino em cadeias laterais de resíduos de lisina (Yang & Seto, 2008a; Mischericow & Heck, 2011; Lee, 2013; Ree *et al.*, 2018); *metilação*, um tipo de alquilação em que um grupo metil (-CH₃), um tipo de grupamento alquila, é adicionado nos átomos de nitrogênio ou oxigênio dependendo da molécula aceptora, em alvos como resíduos de lisina, leucina, histidina, alanina, asparagina, da fração guanidina

de arginina, do grupamento -R de amidas de glutamina e de carboxilatos de aspartato e glutamato (Turner & Clark, 1960; Klotz *et al.*, 1986; Apostol *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2005; Sprung *et al.*, 2008; Yang & Seto, 2008a; Handy *et al.*, 2011; Lee & Lee, 2014; Hwang *et al.*, 2016; van Haren *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2019); *fosforilação*, em que um grupo fosfato (PO_4^{3-}) é adicionado ao oxigênio de serina, treonina e tirosina ou ao nitrogênio de histidina (Klumpp & Krieglstein, 2002; Keshet & Seger, 2010); *nitração*, equivalente à adição de um grupo nitro (NO_2) em resíduos de tirosina; *nitrosilação/nitrosação*, correspondente a adição de NO a grupos amino, átomos de metal centrais ou tióis (Yakovlev & Mikkelsen, 2010); *S-nitrosilação/S-nitrosação*, que se refere à ligação de NO ao átomo de enxofre de um resíduo de cisteína (Marozkina & Gaston, 2012); *sulfatação*, que consiste na adição de um grupamento sulfato (SO_4^{2-}) em resíduos de tirosina ou carboidrato de uma proteína (Bojarová & Williams, 2008); *prenilação/isoprenilação*, que constitui na adição de um grupo isoprenoide em resíduos de cisteína; *palmitoilação*, uma S-acilação que recebe esse nome porque comumente envolve a modificação por um grupo acila de 16 carbonos, o ácido palmítico; *miristoilação*, na qual a glicina N-terminal de proteínas é ligada por uma cadeia acílica de 14 carbonos (Levental *et al.*, 2010); *S-sulfidração*, caracterizada pela adição de sulfeto de hidrogênio (H_2S) na forma de ânion hidrossulfeto em resíduos de cisteína (Kabil & Banerjee, 2010; Olson, 2011); *S-glutationilação*, na qual se forma ligação dissulfeto com a GSH em resíduos de cisteína (Dalle-Donne *et al.*, 2007); *biotinilação*, que representa a ligação de proteínas pela biotina, uma vitamina que age como coenzima: covalentemente ligada a um resíduo de lisina no sítio ativo de enzimas exibe atividades biológicas e metabólicas importantes (Chapman-Smith & Cronan, 1999; Ingaramo & Beckett, 2011); *ubiquitinação*, processamento no qual a proteína de 76 aminoácidos ubiquitina é ligada, normalmente em resíduos de lisina, à substratos proteicos selecionados como alvo do proteassoma guiando a degradação da proteína através de regulação da atividade do proteassoma (Grillari *et al.*, 2010; Song & Luo, 2019); *sumoilação*, evento em que proteínas caracterizadas como pequenos modificadores semelhantes à ubiquitina (*small ubiquitin-like modifier*, SUMO) ligam-se em algum resíduo de lisina de proteínas-alvo em um fenômeno análogo, mas distinto da ubiquitinação (Wilkinson & Henley, 2010); clivagem proteolítica, que diferentemente das outras modificações é irreversível e é caracterizada pela quebra da proteína em polipeptídeos ou peptídeos menores ou, até mesmo, aminoácidos através de hidrólise da ligação por uma protease, formando produtos com nova região N- e C-terminal (Rogers & Overall, 2013); *hidroxilação*, que envolve a conversão oxidativa da ligação entre carbono e hidrogênio para uma entre carbono e um grupo hidroxila em resíduos de prolina,

lisina, asparagina, aspartato, histidina, entre outros (van Staalduinen & Jia, 2014; Zurlo *et al.*, 2016) e; *glicosilação*, em que sacarídeos são adicionados às proteínas (Spiro, 2002).

A modificação pós-traducional de interesse especial nesse trabalho é a glicosilação, que pode ser de cinco tipos: C-ligada, fosfoglicosilação, gliptação, N-ligada e O-ligada (Akmal *et al.*, 2017). Na glicosilação C-ligada, ou C-manosilação, tem-se um evento no qual o carboidrato manose forma uma ligação carbono-carbono a um resíduo de triptofano (Spiro, 2002; Chauhan *et al.*, 2013). Na fosfoglicosilação, os açúcares xilose, fucose, manose, ramnose, galactofuranose ou N-acetil-glucosamina (GlcNAc) formam uma ligação fosfodiéster em resíduos de serina ou treonina, ou seja, não envolve uma conexão entre proteína e sacarídeo por ligação direta ao átomo de fósforo, mas sim ao oxigênio do PO_4^{3-} (Haynes, 1998; Spiro, 2002). A gliptação consiste na montagem da manose ao fosfatidilinositol formando uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI) que forma uma ligação amida com um resíduo de fosfoetanolamina (Coussen *et al.*, 2001; Spiro, 2002). A glicosilação N-ligada é caracterizada pela adição de um oligossacarídeo pré-montado composto inicialmente por glicose, manose e GlcNAc ao nitrogênio de cadeias laterais em resíduos de asparagina das proteínas (Dall'Olio *et al.*, 2011; Shrimal & Gilmore, 2013; Poljak *et al.*, 2017; Poljak *et al.*, 2018). Por último, a atenção deve ser voltada à glicosilação O-ligada. Nessa modalidade de glicosilação, o carboidrato se liga ao oxigênio de um grupo hidroxila contido em um aminoácido, que pode ser serina, treonina, tirosina, hidroxilisina ou hidroxiprolina. Os açúcares capazes de fazer esse tipo de glicosilação são a N-acetil-galactosamina (GalNAc), galactose, manose, fucose, ácido pseudoamínico, xilose, glicose e a GlcNAc. A modificação por GlcNAc é chamada O-GlcNAc ou O-GlcNAcilação, sendo esse o alvo do presente estudo (Spiro, 2002).

2.2.2 Modificações de eventos celulares por O-GlcNAc

A existência de modificações por O-GlcNAc foi descoberta no ano de 1984 ao serem encontrados resíduos de GlcNAc ligados de forma O-glicosídica em proteínas na superfície de linfócitos, apesar de que os experimentos indicavam que a maior parte dessas ligações aparentava estar dentro das células (Torres & Hart, 1984).

A O-GlcNAc é uma modificação pós-traducional reversível e dinâmica de proteínas nucleares e citoplasmáticas caracterizada pela adição de um resíduo de GlcNAc em hidroxilas presentes em seus resíduos de serina e/ou treonina (Wells *et al.*, 2003; Laczy *et al.*, 2009; Lefebvre *et al.*, 2010; Ngoh *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Darley-USmar *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012; Santoyo-Ramos *et al.*, 2012). Esse evento modula a função (Roos *et al.*, 1997), atividade (Cheng & Hart, 2001; Du *et al.*, 2001; Beleznaï & Bagi, 2012; Ma *et al.*, 2013; Zhang

et al., 2015), localização (Zhu *et al.*, 2001; Dudognon *et al.*, 2004; Majumdar *et al.*, 2006; Sayat *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015), renovação ou *turnover* (Cheng & Hart, 2001) e estabilidade de proteínas (Itkonen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017).

A GlcNAc é um monossacarídeo aminado e acetilado cuja nomenclatura química é 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glicose e com fórmula química $C_8H_{15}NO_6$ (Chen *et al.*, 2010). Bioquimicamente, a modificação ocorre quando o carbono anomérico em conformação β do açúcar doador, a GlcNAc, é atacado pelo oxigênio do grupo hidroxila sem o próton das cadeias carbônicas laterais do aminoácido do substrato aceptor, o polipeptídeo (Janetzko & Walker, 2014).

Processos biológicos fundamentais para a atividade celular como transdução de sinal (Yang *et al.*, 2008b), apoptose (Zhu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013), transporte nuclear (Majumdar *et al.*, 2006; Sayat *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015), degradação proteassômica (Han & Kudlow, 1997; Zhang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004), controle do ciclo e do desenvolvimento celular (Shafi *et al.*, 2000; Dudognon *et al.*, 2004; Slawson *et al.*, 2008; Fong *et al.*, 2012; Itkonen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017), reorganização do citoesqueleto (Slawson *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 2009), tráfego celular (Zhu *et al.*, 2001; Dudognon *et al.*, 2004), tradução (Ohn *et al.*, 2008) e transcrição (Han & Kudlow, 1997; Roos *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2002; Majumdar *et al.*, 2006; Sayat *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2011; Fong *et al.*, 2012; Itkonen *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017) são regulados pelas alterações nos níveis de O-GlcNAc (Laczy *et al.*, 2009; Lefebvre *et al.*, 2010; Darley-Usmar *et al.*, 2012).

2.2.3 A via de biossíntese das hexosaminas (VBH): a cascata bioquímica da modificação por O-GlcNAc

A cascata começa com a VBH, que compartilha as primeiras etapas com a via glicolítica. Os passos em comum do processo se iniciam com fosforilação da glicose no interior da célula pela hexoquinase gerando glicose-6-fosfato. Essa molécula é utilizada para a síntese de glicogênio ou é convertida pela glicose-6-fosfato isomerase em frutose-6-fosfato que, por sua vez, irá convergir principalmente para a via da glicólise, com posterior síntese de piruvato, ou seguir a via das hexosaminas propriamente dita.

Nesse ponto, ao interagir com o metabolismo de aminoácidos, a frutose-6-fosfato é utilizada como precursora para a produção de glucosamina-6-fosfato a partir da enzima L-glutamina:D-frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT), numa reação que envolve a glutamina

como doadora de grupamento amino e libera glutamato como produto secundário (Ghosh *et al.*, 1960).

A glucosamina-6-fosfato, por sua vez, interage com a via dos ácidos graxos, sendo submetida a uma reação bioquímica subsequente de acetilação catalisada pela glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferase, em que a acetilcoenzima A (acetil-CoA) atua como doadora do grupo acetila para a formação da N-acetil-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6P) (Davidson *et al.*, 1957), que posteriormente sofre uma isomerização em N-acetil-glucosamina-1-fosfato (GlcNAc-1P) mediada enzimaticamente pela fosfoacetilglucosamina mutase (Reissig, 1956). Essa enzima requer um açúcar difosfato como co-substrato, magnésio e um quelante de íon metálico para obter atividade ótima (Fernandez-Sorensen & Carlson, 1971). Nessa reação, o substrato principal é um açúcar monofosfato que interage com a forma fosforilada dessa enzima. Como produto intermediário, é gerado um açúcar difosfato no qual um segundo carbono que está em outra posição é então fosforilado a partir da desfosforilação da enzima em questão. No final, a enzima é fosforilada novamente, mas a partir do grupamento que recebe do carbono que estava inicialmente fosforilado antes da reação. O produto final gerado então é um segundo açúcar monofosfato, que é diferente do primeiro justamente por conter agora a fosforilação em um novo carbono, distinto daquele em que o açúcar estava inicialmente fosforilado e que faz parte de uma outra posição na molécula (Cheng & Carlson, 1979).

A via então cruza com o metabolismo dos nucleotídeos e a uridina difosfato-N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc) é sintetizada como produto final através da ação catalítica da UDP-GlcNAc pirofosforilase utilizando uridina trifosfato (UTP) com a liberação de pirofosfato (PPi) como subproduto enzimático (Cabib *et al.*, 1953). Dessa forma, essa cascata de reações bioquímicas que constitui a VBH e que culmina na síntese do substrato UDP-GlcNAc doador do açúcar precede a modificação por *O*-GlcNAc. Cada etapa da síntese da UDP-GlcNAc a partir da glicose foi explicada de forma detalhada e na íntegra anteriormente. No entanto, essa explicação foi feita principalmente com base em trabalhos que descrevem cada ponto da via separadamente conforme eram elucidados um por um, mas uma visão completa dessa via também foi utilizada como embasamento e pode ser revisada em Laczy *et al.*, 2009; Lefebvre *et al.*, 2010; Hanover *et al.*, 2010; Ngoh *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Darley-USmar *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012; Santoyo-Ramos *et al.*, 2012; Chiaradonna *et al.*, 2018.

O processo final da *O*-GlcNAc é regulado por duas enzimas que controlam os níveis de proteínas modificadas: A uridina difosfo-N-acetilglucosamina:polipeptídeo beta-N-acetilglucosaminiltransferase ou *O*-GlcNAc transferase (OGT) e a N-acetil-beta-D-glucosaminidase ou *O*-GlcNAcase (OGA). A UDP-GlcNAc é utilizada como substrato da

OGT, que é a responsável por transferir os resíduos de GlcNAc liberando-os da uridina difosfato (UDP) e adicionando-os nos sítios de serina e/ou treonina das proteínas, modificando-as. A OGA catalisa a reação inversa e remove os resíduos de GlcNAc das proteínas modificadas (Laczy *et al.*, 2009; Lefebvre *et al.*, 2010; Hanover *et al.*, 2010; Ngoh *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Darley-USmar *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012; Santoyo-Ramos *et al.*, 2012; Chiaradonna *et al.*, 2018).

Figura 3 – VBH e modificação por O-GlcNAc. Representação esquemática da VBH e da O-GlcNAc, na qual os nomes dos substratos estão escritos em preto; das enzimas, em laranja; das vias metabólicas que intercedem a VBH, em verde; dos co-substratos, em azul; dos subprodutos, em vermelho; e da via metabólica paralela, em roxo. Adaptado de Laczy *et al.* (2009), Lefebvre *et al.* (2010), Hanover *et al.* (2010), Ngoh *et al.* (2010), Lima *et al.* (2011), Darley-USmar *et al.* (2012), Lima *et al.* (2012), Santoyo-Ramos *et al.* (2012) e Chiaradonna *et al.* (2018).

2.2.4 O-GlcNAc e doenças cardiovasculares

A produção normal de NO é importante para prevenir doenças vasculares. A hiperglicemia aguda prejudica a vasodilatação dependente de endotélio tanto na microcirculação quanto na macrocirculação em indivíduos normais e também em diabéticos, indicando alterações na eNOS no diabetes. A atividade da eNOS depende de sua fosforilação no resíduo de serina 1177 pela proteína cinase Akt. A hiperglicemia aumenta a modificação por O-GlcNAc nesse mesmo sítio diminuindo a sua fosforilação e, conseqüentemente, a atividade da eNOS (Du *et al.*, 2001). Esse evento também contribui para a disfunção erétil associada ao diabetes (Musicki *et al.*, 2005). Em indivíduos normais, a hiperglicemia aguda leva a resistência insulínica passageira e inibe a dilatação dependente de endotélio (Ramos *et al.*, 2008). A O-GlcNAc apresenta relação direta com resistência à insulina, uma vez que a translocação da OGT do núcleo para a membrana plasmática acarreta em modificações da Akt, inibindo sua fosforilação e ativação induzidas por insulina, interferindo assim, na sinalização por esse hormônio (Yang *et al.*, 2008b).

O fluxo aumentado da VBH leva à ativação do NF- κ B e à expressão de VCAM-1 em células mesangiais de ratos, o que contribui para a lesão tecidual, fibrose e glomerulosclerose. Além disso, sabendo-se que aumento de fluxo pela VBH é uma das conseqüências adversas à alta concentração de glicose no diabetes, esse é um potencial mecanismo na patogênese da doença renal crônica que pode se desenvolver em diabéticos (James *et al.*, 2002).

A hipertensão arterial é marcada por disfunção vascular estrutural e funcional. As alterações vasculares estruturais envolvem hipertrofia e remodelamento, enquanto as alterações vasculares funcionais envolvem disfunção endotelial, maior reatividade a agentes vasoconstritores como ET-1 e Ang II e menor relaxamento vascular (Mitsui *et al.*, 2003; Schiffrin, 2005; Touyz, 2005). Em ratos com hipertensão induzida por acetato de desoxicorticosterona (*deoxycorticosterone acetate*, DOCA) e sal, os níveis de O-GlcNAc estão aumentados, assim como a reatividade vascular a estímulos contráteis, tanto em artérias de condutância como em artérias de resistência, conforme demonstrado, respectivamente, em aortas torácicas e ramos de segunda ordem de artérias mesentéricas. Nas artérias de condutância, há tanto aumento de contração como diminuição da dilatação em resposta a ACh. Além disso, a incubação dos vasos com uma droga que aumenta a modificação por O-GlcNAc, aumentou a reatividade à estímulo contrátil em ambos segmentos arteriais de ratos normotensos, mas não de ratos hipertensos. Além disso, o uso dessa droga diminui a resposta vasodilatadora à ACh nas artérias de condutância, mas também apenas em ratos normotensos (Lima *et al.*, 2009). O peptídeo ET-1, além de ser um potente vasoconstritor por si só, também

modula modificações por *O*-GlcNAc, fato comprovado pela respectiva redução nas taxas de *O*-GlcNAc vascular frente ao uso de antagonista para receptores de ET-1 (Lima *et al.*, 2010).

A apneia obstrutiva do sono é caracterizada por episódios recorrentes de hipóxia, com consequente efeito cardiovascular. Na hipóxia, as taxas miocárdicas de *O*-GlcNAc aumentam, acompanhadas de elevação nos níveis de NF- κ B, das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6, de caspase-3 e de apoptose em cardiomiócitos (Guo *et al.*, 2015). Ademais, a alta ingestão de glicose, que progride para a síndrome metabólica, leva a modificações por *O*-GlcNAc de proteínas no tecido adiposo perivascular reduzindo seus efeitos anti-contráteis (Da Costa *et al.*, 2018).

Como mencionado inicialmente, os eventos celulares e moleculares presentes na aterosclerose são eventos ou processos passíveis de modulação pela modificação por *O*-GlcNAc. Em células endoteliais (Ju *et al.*, 2008) e de músculo liso vascular (Xing *et al.*, 2011), as alterações por *O*-GlcNAc influenciam o padrão de resposta inflamatória por interferir na expressão de mediadores inflamatórios incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. A atividade de fatores de transcrição pró-inflamatórios também é modulada, afetando sua sinalização e respostas que influenciam, por exemplo, a produção de citocinas. A modificação por *O*-GlcNAc também altera a atividade de diversas proteínas endoteliais que regulam o citoesqueleto, como a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, as enzimas fosfolipase C, proteína cinase C, enzimas da via da Akt ou proteína cinase B e a eNOS (Lima *et al.*, 2008). A modificação por *O*-GlcNAc também é importante no estresse oxidativo, como demonstrado em cardiomiócitos (Ngoh *et al.*, 2011), em rins (Hu *et al.*, 2017) e artérias (Souza-Silva *et al.*, 2018).

Esses efeitos do aumento de *O*-GlcNAc também podem contribuir para alterar a infiltração de granulócitos e monócitos em artérias submetidas à injúria endoluminal (Xing *et al.*, 2008), bem como modular a reatividade vascular em condições afetadas por estímulos inflamatórios (Hilgers *et al.*, 2012), como observado na sepse (Silva *et al.*, 2019). Como esses eventos – estresse oxidativo, inflamação e disfunção vascular – são determinantes no processo de aterosclerose, a modificação por *O*-GlcNAc pode ter papel chave nessa condição patológica.

Justificativa

3. Justificativa

A aterosclerose é uma condição patológica arterial crônica que contribui para outros processos fisiopatológicos como IM e AVE, sendo inclusive a principal causa de doenças vasculares e de mortes decorrentes dessas complicações ao redor do mundo. A presença de placas ateroscleróticas é um indicador de risco vascular e, portanto, um problema de saúde pública. Estudar o papel da *O*-GlcNAc na aterosclerose é relevante para compreender melhor a fisiopatologia da doença e fomentar possíveis alvos terapêuticos. A compreensão desse papel da *O*-GlcNAc na aterosclerose pode resultar na identificação de potenciais vias para alvos terapêuticos, tendo em vista que em outras doenças do sistema cardiovascular esse mecanismo é importante para a modificação de eventos inflamatórios e oxidativos. As proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, bem como a expressão e atividade das enzimas que controlam este processo, por exemplo, ainda não foram avaliados nessa doença. Logo, a proposta é de grande interesse e relevância para as Ciências Biomédicas e Medicina Cardiovascular.

Hipótese

4. Hipótese

Sabendo-se que a aterosclerose envolve fenômenos celulares e moleculares complexos e que a *O*-GlcNAc é uma potencial moduladora de várias dessas funções, consideramos que esta seria uma variável importante a ser estudada nesse cenário.

Apesar da literatura ainda ser escassa em relação a estudos que comparam a participação da modificação por *O*-GlcNAc na aterosclerose, essa modificação pós-traducional modula diversos fatores ou eventos que estão comprometidos, ou que contribuem para a patogênese da aterosclerose. Os níveis de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, bem como a expressão e atividade das suas enzimas reguladoras, por exemplo, ainda não foram avaliados nessa fisiopatologia. Dessa forma, compreender melhor qual a participação desse mecanismo na aterosclerose pode contribuir para entendermos parte do processo de formação das placas ateroscleróticas e fomentar possíveis alvos para intervenções terapêuticas futuras. Logo, esse estudo propõe avaliar se ocorrem modificações relacionadas à *O*-GlcNAc e se as mesmas interferem com o desenvolvimento de placas ateroscleróticas.

Considerando que o aumento da modificação por *O*-GlcNAc reduz a expressão de citocinas e quimiocinas e leva a redução de processos inflamatórios, foi hipotetizado, então, que esse aumento da modificação por *O*-GlcNAc é benéfico por seus efeitos anti-inflamatórios e protege da formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica.

Figura 4 – Esquema representativo da hipótese.

Objetivos

5. Objetivos

5.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do aumento das proteínas modificadas por *O*-GlcNAc nas principais características que determinam o desenvolvimento da placa aterosclerótica, como a (dis)função endotelial, perfil inflamatório e estresse oxidativo.

5.2 Objetivos específicos

- Comparar o nível global de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc e a expressão das enzimas que regulam esse sistema entre regiões com e sem placa aterosclerótica.
- Caracterizar, em modelo animal, o desenvolvimento de placas ateroscleróticas e as características pró-inflamatórias e pró-oxidativas relacionadas.
- Determinar se o tratamento com uma droga que eleva os níveis de *O*-GlcNAc (Thiamet G) altera características fundamentais no desenvolvimento da placa aterosclerótica, tais como parâmetros lipídicos, perfil inflamatório e estresse oxidativo.
- Determinar *in vitro* em células endoteliais o potencial mecanismo envolvido nessas alterações.

Material e métodos

6. Material e métodos

6.1 Animais

Os protocolos experimentais estão de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA-FMRP-USP) (protocolo 229/2017).

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J selvagens (*wild-type*, WT) adquiridos do Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e *knockouts* para apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) no *background* de camundongos também da linhagem C57BL/6J e que foram obtidos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram alocados no Biotério de Manutenção do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo onde foram acondicionados em caixas de polipropileno de 30 cm de comprimento, 20 cm de largura e 13 cm de altura, que continham cada uma de dois a quatro animais, de forma que tiveram todos acesso integral à comida e água. Todos os animais também foram mantidos em sala sob ciclos claro/escuro de 12 h e com temperatura e umidade controladas estabelecidas em valores, respectivamente, de 23-24 °C e de 80 ± 5%.

6.2 Dieta hipercolesterolêmica e indução de aterosclerose

Camundongos WT receberam dieta controle padrão (*standard chow*) durante todo o curso experimental até a eutanásia, na 23ª semana de vida, e foram chamados de animais WT (chow). Camundongos ApoE^{-/-} receberam *standard chow* somente até o início da 15ª semana e a ração tipo Western, constituída por manteiga de cacau 15% (p/p) e colesterol 0,25% (p/p), a partir do início da 15ª semana até o início da 23ª semana, sendo os animais então submetidos a eutanásia, após um total de 8 semanas recebendo a dieta hipercolesterolêmica. Esses camundongos foram classificados como ApoE^{-/-} (western). Conforme previamente descrito também em modelo murino de animais (Nakashima *et al.*, 1994), a dieta hipercolesterolêmica foi utilizada para acelerar o desenvolvimento de processo aterosclerótico nos camundongos.

Assim como foi estipulado para os animais ApoE^{-/-} (western), alguns camundongos WT receberam inicialmente *standard chow*, mas apenas até o início da 15ª semana de vida e que foi substituída posteriormente – do início da 15ª semana até o início da 23ª semana – por dieta tipo Western, constituída por manteiga de cacau 15% (p/p) e colesterol 0,25% (p/p), totalizando 8 semanas em dieta hipercolesterolêmica antes da eutanásia. Esses animais foram denominados

WT (western). Este grupo de camundongos foi designado para experimentos que foram realizados com o objetivo de avaliar se a dieta hipercolesterolêmica induz em animais WT, algumas das alterações observadas em camundongos ApoE^{-/-}, como por exemplo, presença de placas ateroscleróticas no arco aórtico.

Alguns animais WT que receberam apenas *standard chow* foram submetidos a eutanásia na 15ª semana de vida para ensaios específicos de reatividade vascular, conforme protocolo a ser descrito adiante. No entanto, a eutanásia dos demais camundongos citados anteriormente, que, por sua vez, pertencem aos grupos WT (chow), ApoE^{-/-} (western) e WT (western), foi executada no início da 23ª semana, conforme mencionado, quando também foi realizada coleta de tecidos e sangue, os quais foram destinados a ensaios posteriores.

6.3 Tratamento farmacológico

Os animais WT (chow) e ApoE^{-/-} (western) foram submetidos à administração de veículo (solução salina fisiológica 0,9%) ou Thiamet G, um inibidor da OGA cujo efeito é aumentar o nível global de proteínas modificadas por O-GlcNAc. O Thiamet G foi administrado, por via intraperitoneal, na dose de 5 mg/kg, três vezes por semana. Com início na 20ª semana, o tratamento foi mantido até a 23ª semana, ou seja, durante período de 3 semanas, que antecedeu a eutanásia.

6.4 Determinação da massa corporal dos animais

A fim de avaliar a evolução ponderal, os animais foram pesados na 15ª e 23ª semanas, o que correspondeu à massa corporal inicial e final, respectivamente. A partir desses valores, foi calculado também o ganho de massa. Os resultados dessas medidas foram expressos em g.

6.5 Cultivo de células endoteliais humanas

Células endoteliais de veia umbilical humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) da linhagem EA.hy926 (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram cultivadas em garrafas contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle medium*, DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) na presença de penicilina-estreptomicina (100 UI/mL + 100 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL), em estufa a 37 °C, úmida e com 5% de dióxido de carbono (CO₂).

O meio das garrafas foi frequentemente trocado (2-3 vezes por semana) após duas lavagens com tampão salina fosfato (*phosphate buffer saline*, PBS). Após confluência, foram realizados repiques nos quais as células de uma única garrafa eram transferidas de forma

dividida para outras novas garrafas. Nesse procedimento, as células eram distribuídas para mais de uma garrafa, usualmente três ou quatro. Para isso, após a garrafa anterior ser lavada duas vezes com PBS, uma solução de tripsina foi utilizada durante as passagens para desaderir as células e permitir a sua separação em novos frascos.

Para os estímulos com as drogas e reagentes usados nesse trabalho, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços (1×10^6 células/poço) ou de 96 poços (3×10^4 células/poço). Após padronização, todos os estímulos utilizados tiveram duração de 6 ou 24 h.

6.6 Avaliação da função vascular

Após anestesia com isoflurano, camundongos C57BL/6J WT e ApoE^{-/-} foram eutanasiados e a aorta torácica foi rapidamente removida e imediatamente transferida para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit modificada, constituída por 130 mM de cloreto de sódio (NaCl), 4,7 mM de cloreto de potássio (KCl), 1,18 mM de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), 1,18 mM de sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O), 14,9 mM de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 5,5 mM de glicose, 1,6 mM de cloreto de cálcio diidratado (CaCl₂.2H₂O) e 0,027 mM de sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético (Na₂EDTA), a 4 °C. Essa solução tampão foi adaptada de uma receita descrita anteriormente (Angus & Wright, 2000).

A gordura perivascular e tecidos conectivos foram removidos da aorta e a porção mediana de cada um desses vasos foi dividida em quatro anéis de aproximadamente 2-3 mm de comprimento. Foram estipulados dois protocolos experimentais distintos: No primeiro deles, realizou-se um ensaio em que foram usados segmentos de aorta tanto de animais WT (chow) quanto de camundongos ApoE^{-/-} (western) com 23 semanas de vida previamente tratados com Thiamet G ou veículo para avaliar os efeitos desse tratamento *in vivo*. Nesse protocolo, o ensaio foi realizado com apenas um dos anéis obtidos de um ramo inteiro de aorta torácica que foi coletada de um único animal. No segundo protocolo, foram utilizados apenas vasos de camundongos WT, sem tratamento, em dieta normal e com 15 semanas de vida. Assim sendo, os estudos foram conduzidos de forma que os anéis aórticos desses animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos de tratamento diferentes para avaliar os efeitos *in vitro* de Thiamet G e/ou LPC. Dessa maneira, os quatro grupos ficaram definidos da seguinte forma: 1) controle (PBS), 2) LPC 10^{-5} M, 3) Thiamet G 10^{-6} M e 4) LPC 10^{-5} M + Thiamet G 10^{-6} M. Nesse protocolo, todos os segmentos obtidos de um ramo inteiro de aorta torácica de apenas um animal podiam ser aproveitados, sendo que esses segmentos eram realocados, cada um, para grupos experimentais distintos. Baseado nesse desenho experimental, os anéis de aorta foram

então incubados, segundo os grupos experimentais anteriores, em DMEM suplementado com 10% de SFB na presença de penicilina-estreptomicina (100 UI/mL + 100 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL), em estufa a 37 °C, úmida e com 5% de CO₂ por 24 h para posteriores ensaios de reatividade vascular.

Nos estudos de reatividade vascular com registro de força isométrica, cada um dos anéis de aorta foi montado em um miógrafo multicanais, modelo 620 M (Danish Myo Technology, Hinnerup, Dinamarca). As cubas continham solução de Krebs-Henseleit modificada, aquecida a 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica de 95% de oxigênio e 5% de CO₂ para manter um valor de pH de aproximadamente 7,4. Os anéis foram colocados no sistema de modo que ficassem presos por meio de dois ganchos metálicos paralelos. Esses anéis foram encaixados nos ganchos de forma que ambos passassem por dentro do lúmen do vaso e estivessem posicionados entre as paredes internas do anel de maneira a conseguir segurá-las. Os dois ganchos consistiam em duas hastes de aço inoxidável, uma móvel e a outra, fixa, conectada a um transdutor de força PowerLab 8/SP (ADInstruments, Sydney, Austrália). Esse dispositivo atua como um sistema de aquisição de dados e um conversor analógico-digital que, por sua vez, está acoplado a um computador. O *software* de análise de dados LabChart, versão 6.0 (ADInstruments, Sydney, Austrália) foi utilizado como a plataforma de interface.

As preparações foram submetidas a uma tensão basal de 5 mN e um período de estabilização de 1 h. Durante esse intervalo de estabilização, os vasos foram submetidos a ajustes de tensão e trocas periódicas da solução nutriente fisiológica a cada 10 min. Essa reposição era necessária para manter a integridade do vaso, evitando o acúmulo de metabólitos e restaurando os níveis necessários de certas substâncias importantes para o metabolismo vascular. Depois da etapa de estabilização, os segmentos arteriais foram estimulados com solução de Krebs contendo alta concentração de KCl (120 mM). Essa etapa é crucial para confirmar a viabilidade funcional do músculo liso vascular e estabelecer um parâmetro de referência, a partir do qual a contração relativa foi calculada. Vasos que não responderam com contração ao KCl foram considerados inadequados para o experimento e foram excluídos. Considerando o requisito anterior, o protocolo foi seguido apenas nas preparações de anéis de aorta que responderam ao KCl. Logo após, os vasos foram lavados e estabilizados por 30 min. A integridade do endotélio foi testada com ACh 10⁻⁵ M em vasos pré-contraídos com fenilefrina (*phenylephrine*, PE) 10⁻⁶ M. A ausência de resposta à ACh foi critério de exclusão dos vasos para os experimentos. Dessa maneira, todos os protocolos experimentais foram realizados em vasos com endotélio.

Curvas concentração-resposta para PE, ACh e nitroprussiato de sódio (NPS) foram executadas partindo de uma concentração de 10^{-10} M até 10^{-4} M de cada droga individualmente. As curvas concentração-resposta para PE foram realizadas após o teste de presença do endotélio, mas apenas após lavagem da preparação com solução fisiológica nutriente e um período de 30 min de estabilização. Da mesma forma, curvas concentração-resposta para ACh ou NPS foram realizadas em vasos pré-contraídos com PE 10^{-6} M, após a resposta contrátil ter atingido um platô, o que confirmava a manutenção do tônus e indicava condições adequadas para a continuidade do experimento.

A resposta vasoconstritora induzida pela PE foi expressa como porcentagem da força de contração em relação à resposta máxima de contração por KCl, esta fornecida em mN. A vasodilatação induzida por ACh ou NPS foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração induzida por PE.

6.7 Análises bioquímicas

O sangue foi coletado pelo plexo orbital dos animais e centrifugado a 1.500 rpm por 15 min a 4 °C para a obtenção do soro. A avaliação da concentração sérica de colesterol total, HDL, triglicerídeos e glicose foi feita com kits de ensaio colorimétricos enzimáticos comerciais da Labtest® (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). Os valores de VLDL e de LDL foram estimados pelas equações de Friedewald, em que $VLDL (mg/dL) = Triglicerídeos (mg/dL)/5$ e $LDL (mg/dL) = colesterol\ total (mg/dL) - [HDL (mg/dL) + VLDL (mg/dL)]$ (Friedewald *et al.*, 1972).

Para quantificar o colesterol total, 10 µL de amostra, padrão ou água usada como branco foram adicionadas em 0,6 mL de reagente específico. A mistura foi colocada em banho-maria a 37 °C por 10 min. Um volume fixo foi transferido para placa de 96 poços e a leitura foi feita a 500 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas Epoch (BioTek, Winooski, VT, EUA).

Para medir a HDL, 40 µL de soro foram misturados a 40 µL de precipitante e agitados em vórtex por 30 seg. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 min. Posteriormente, 60 µL do sobrenadante foram coletados e adicionados a 0,6 mL de reagente específico. Os mesmos procedimentos foram realizados para o padrão e com água, que por sua vez, foi usada como branco. A mistura foi colocada em banho-maria a 37 °C, por 10 min. Um volume fixo foi transferido para placa de 96 poços e a leitura foi feita a 500 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas Epoch (BioTek, Winooski, VT, EUA).

Para dosar os triglicerídeos, 10 µL da amostra, padrão ou água, usada como branco, foram adicionados a 0,6 mL de reagente específico. A mistura foi aquecida em banho-maria a

37 °C durante 10 min. Um volume fixo foi transferido para placa de 96 poços e a leitura foi feita a 505 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas Epoch (BioTek, Winooski, VT, EUA).

Para determinar a concentração de glicose, 0,6 mL de reagente específico foi adicionado a 10 µL da amostra, padrão ou água, usada como branco. A mistura foi aquecida em banho-maria a 37 °C durante 10 min. Um volume fixo foi transferido para placa de 96 poços e a leitura foi feita a 505 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas Epoch (BioTek, Winooski, VT, EUA).

6.8 Análises histológicas

Os arcos aórticos dos animais foram removidos, lavados com PBS, fixados em solução tamponada de paraformaldeído a 4%, emblocados em meio de criopreservação e submetidos a cortes transversais de 6 µm em criostato. As secções foram então colocadas em lâminas que foram estocadas a -20 °C. Em etapas posteriores, para hidratação, as lâminas foram mergulhadas nas seguintes soluções sequencialmente e durante 3 min cada: xilol I, xilol II, mistura álcool etílico e xilol 1:1, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool 95%, álcool 70% e água destilada. Depois, para a coloração de hematoxilina e eosina (HE), as lâminas foram mergulhadas em hematoxilina por 1-2 min e, em seguida, numa solução de eosina-floxina, também por 1-2 min. Para desidratação e diafanização, as lâminas foram mergulhadas nas seguintes soluções, em ordem inversa da sequência anterior, durante 3 min cada: álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto II, álcool absoluto I, solução álcool e xilol 1:1, xilol II e xilol I. As imagens foram obtidas por microscopia de campo claro em microscópio Olympus BX50 (Olympus, Shinjuku, Tóquio, Japão).

6.9 Avaliação da geração de EROs *in situ* por diidroetidina (DHE)

Suzuki *et al.* (1995) descreveram um método no qual a DHE, um precursor reduzido não fluorescente do brometo de etídeo poderia detectar EROs. Essa propriedade da DHE decorre de sua característica de ao ser oxidada dentro da célula resultar na geração de um composto fluorescente, o brometo de etídeo, que por sua vez tem afinidade e liga-se ao DNA emitindo fluorescência no comprimento de onda do vermelho.

Os arcos aórticos dos animais foram removidos, lavados com PBS, fixados em solução tamponada de paraformaldeído a 4%, emblocados em meio de criopreservação e submetidos a cortes transversais de 6 µm em criostato. As secções foram então colocadas em lâminas silanizadas que foram estocadas a -20 °C. Para o ensaio, as lâminas foram incubadas em estufa

a 37 °C por 10 a 15 min para remoção do meio de criopreservação e fixação. Os cortes foram reidratados com 100-150 µL de PBS e colocados em estufa a 37 °C por 10 min dentro de câmara úmida. Depois as lâminas foram secadas cuidadosamente e as secções transversais do arco aórtico foram incubadas com a sonda DHE 2,5 µM para avaliar a produção de EROs. As lâminas foram novamente colocadas em estufa a 37 °C dentro de câmara úmida, mas por 30 min. Depois, no escuro, as lâminas foram secadas cuidadosamente e lavadas três vezes com PBS, de modo que, em cada lavagem, os cortes ficavam expostos ao PBS durante aproximadamente 3-5 min e o excesso era descartado vertendo-se a lâmina e deixando o PBS escorrer para realizar a lavagem seguinte. Para realizar uma contracoloração que marcasse núcleo, devido sua afinidade considerável pelo DNA, mas também por ligar-se parcialmente ao RNA, o reagente Fluoroshield™ com DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi então gotejado em cada lâmina que, por sua vez, foi posteriormente montada com a lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus BX50 (Olympus, Shinjuku, Tóquio, Japão) com filtro para rodamina. A localização da geração de EROs foi realizada visualmente, observando-se núcleos marcados com fluorescência vermelha proveniente dos produtos de oxidação da DHE. A geração de EROs foi quantificada através da densidade luminosa corrigida pela área utilizando o programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência.

6.10 Avaliação da expressão gênica

A expressão dos genes nos segmentos vasculares do arco aórtico e da aorta torácica foi avaliada por reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa quantitativa em tempo real (*quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction*, qRT-PCR). As amostras coletadas foram acondicionadas em microtubos plásticos para posterior extração do RNA total. As amostras de tecido foram trituradas em nitrogênio líquido e, a partir desse ponto, o protocolo foi seguido em condições livres de RNase (*RNase free*). O RNA total foi extraído de cada amostra através da adição de 1 mL do reagente TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), uma solução química usada na extração de DNA, RNA e proteínas das células. Através do auxílio de uma pipeta, as amostras foram homogeneizadas no TRIzol™ sugando e dispensando a mistura algumas vezes até que essa repetição atingisse um número considerado suficiente. Logo depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4 °C por 5 min e o sobrenadante transferido para outro microtubo que foi incubado à temperatura ambiente por 5 min para completa dissociação do complexo nucleoproteico.

Para separar os ácidos nucleicos, 200 µL de clorofórmio foram adicionados em cada microtubo, que depois foram submetidos a agitação manual vigorosa por 15 seg e então incubados a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4 °C por 15 min. A fase superior, que é aquosa e contém o RNA, foi transferida para outro microtubo. A fase intermediária, formada pelo DNA, e a inferior contendo proteínas, lipídeos e outras macromoléculas e que corresponde à fase orgânica apolar, foram descartadas.

Para precipitar o RNA, a fase aquosa contendo RNA foi submetida à adição de 500 µL de isopropanol, sendo em seguida incubada por 10 min à temperatura ambiente e então centrifugada a 12.000 rpm a 4 °C por 10 min. O sobrenadante resultante foi desprezado e ao *pellet* formado foi adicionado 1 mL de etanol absoluto para lavar o RNA e garantir a remoção de sobras que incluem possíveis resquícios de sal e isopropanol, bem como torná-lo mais hidrossolúvel. Logo depois, as amostras foram agitadas brevemente em vórtex e centrifugadas a 7.500 rpm a 4 °C por 5 min. Verteu-se o sobrenadante e o *pellet* foi incubado a temperatura ambiente por 5-10 min. Logo em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado com 16 µL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

A quantificação do RNA total foi feita em espectrofotômetro leitor de microplacas Epoch (BioTek, Winooski, VT, EUA) utilizando uma placa de microvolume Take3 (BioTek, Winooski, VT, EUA). Foram realizadas leituras a 260 e 280 nm. O critério de pureza utilizado foi baseado na razão entre a leitura de 260 e 280 nm que quantifica respectivamente RNA e proteínas. Um valor menor que 1,6 para determinada amostra foi considerado como indicativo de contaminação por proteínas. Foram utilizados 2 µL de amostra para leitura e a concentração foi fornecida em ng/µL.

A reação de transcrição reversa consiste na conversão do RNA, que é usado como molde, em DNA complementar (cDNA). Essa etapa foi realizada através do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação foi preparada com 2 µL do tampão RT 10X, 0,8 µL do *mix* de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) 25X, 2 µL de *primers* randômicos RT, 1 µL da solução da enzima transcriptase reversa MultiScribe™, 4,20 µL de água livre de nuclease e 10 µL da amostra, totalizando um volume de 20 µL. Para a produção do cDNA, as amostras, após a adição dos reagentes necessários, foram incubadas em um termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com ciclos a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min.

A expressão gênica foi determinada pela sonda Taqman® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os reagentes foram preparados de forma a adquirir um volume suficiente para realizar o ensaio com todas as amostras em duplicata, levando em consideração que para

uma única reação seriam necessários 1 µL da solução 20X Taqman® Gene Expression Assay, 10 µL da solução 2X TaqMan® Gene Expression Master Mix e 5 µL de água livre de RNase. A primeira solução continha os *primers forward* e *reverse* e uma sonda constituída por um oligonucleotídeo com um corante sinalizador fluorescente (*reporter*) na extremidade 5' e um corante silenciador (*quencher*) na extremidade 3'. A segunda solução continha a enzima Taq DNA polimerase e os dNTPs, ambos em solução de tampão de trabalho. Para cada reação foram utilizados 4 µL do cDNA obtido nas etapas anteriores. Os microtubos aos quais foram adicionadas as amostras de cDNA e os reagentes foram invertidos várias vezes para misturar os componentes. Então, foram posteriormente centrifugados a 3.000 rpm por 3 min. Os 20 µL da mistura de amostra e reagentes foram pipetados em poços de uma placa de 96 poços. As placas foram seladas e centrifugadas a 3.000 rpm por 3 min. Essas amostras foram incubadas a 50 °C por 2 min, em seguida a 95 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 seg e a 60 °C por 1 min no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), no qual a quantificação das amplificações também foi realizada.

Durante a reação, as fitas de DNA se separam e os *primers forward* e *reverse* se ligam ao cDNA de modo a flanquear o gene de interesse se a sequência alvo estiver presente. Um dos *primers* se pareia na extremidade 3' de uma das fitas enquanto o segundo, da mesma forma que o *primer* anterior, também se liga à uma extremidade 3', mas na fita paralela adjacente complementar do mesmo cDNA e que por isso se refere a uma região oposta ao primeiro *primer*. Assim, ambos os *primers* flanqueiam a região a ser amplificada. A sonda Taqman® se anela em alguma região entre os *primers* e estando intacta o seu sinal fluorescente é silenciado. Quando os *primers* são estendidos pela Taq DNA polimerase, a sonda é clivada sendo removida da fita alvo e separando o fluoróforo de seu silenciador. Os *primers* então se estendem até o final da fita molde e o sinal do corante fluorescente que agora foi liberado é então detectado.

Os resultados foram analisados através do método comparativo de ciclo limiar (*threshold cycle*, Ct). Computacionalmente, cada gene tem um valor limiar de expressão que é fixado e se relaciona com a detecção de sua amplificação pelo equipamento acima do sinal fluorescente de fundo que é emitido durante os primeiros ciclos. Essa informação é o Ct e está relacionada ao número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação atinge o limite de positividade e cruza essa linha limiar. Ou seja, esse nível exigido de sinal é baseado na linha de base que é ajustada conforme o sinal fluorescente de fundo emitido antes da amplificação do gene alvo ser detectada pelo aparelho e no número de ciclos que o instrumento precisa para poder detectar a amplificação desse gene de interesse.

Para normalizar, inicialmente calculou-se a média das subtrações dos valores do gene alvo da amostra controle pelos valores do gene normalizador/*housekeeping* da amostra controle respectiva resultado no ΔCt controle. Depois foram calculadas as subtrações dos valores do gene alvo das amostras controle ou do teste experimental de interesse pelos seus respectivos valores do gene normalizador/*housekeeping* resultando em um ΔCt que posteriormente foi subtraído pelo ΔCt controle calculado anteriormente. Isso resultou no valor ΔCt duplo ($\Delta\Delta\text{Ct}$) que por ser logarítmico foi corrigido por logaritmo ($\log_{10}$) e gerou os valores $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

6.11 Avaliação da expressão proteica

6.11.1 Extração de proteínas

A extração de proteínas do arco aórtico dos animais e das células endoteliais foi feita com tampão de lise celular constituído por 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 1 mM de ortovanadato de sódio (Na_3VO_4), 10 mM de fluoreto de sódio (NaF) e coquetel de inibidor de proteases *SigmaFAST™ Protease Inhibitor Tablets* - S8820 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluídos em água ultrapurificada. No caso dos tecidos, eles foram pulverizados em nitrogênio líquido e colocados em microtubos onde foram posteriormente adicionados 100 a 150 μL do tampão de lise para cada amostra, dependendo do tamanho do tecido. Para as células que foram destinadas a esse ensaio, o cultivo e o estímulo foram feitos previamente em placas de 6 poços. Ao final do estímulo, os poços foram lavados duas vezes usando, em cada lavagem, 2 mL de PBS a 4 °C. Posteriormente, 70 μL do tampão de lise foram adicionados em cada um dos poços que continham células estimuladas. A remoção das células aderidas na superfície do fundo do poço foi feita mecanicamente através de raspagem e espalhando-se o tampão de lise. A suspensão obtida era então recolhida e transferida para microtubos com o auxílio de uma pipeta. Cada amostra, tanto de tecido quanto de células foi agitada em vórtex e submetida à homogeneização orbital vertical durante 1 h a 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 13.000 rpm. O sobrenadante que consistia no extrato proteico foi recolhido e colocado em outro microtubo, enquanto o anterior contendo o *pellet* constituído de detritos celulares era descartado. A concentração do extrato proteico foi determinada pelo protocolo de Bradford, descrito a frente, para enfim alíquotas dessas amostras serem submetidas ao método de avaliação da expressão de certas proteínas específicas ou para, quando fosse o caso, determinação dos níveis globais de modificação de proteínas por O-GlcNAc nessas mesmas amostras.

6.11.2 Dosagem de proteínas por Bradford

Para a determinação da concentração proteica nas amostras foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976). A cada experimento foi construída uma curva-padrão com solução de albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*, BSA) nas concentrações de 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 mg/mL. Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 10 µL das amostras, do branco ou das soluções de referência para reagir com 200 µL do reagente de Bradford, que por sua vez sempre era adicionado por último. Quando necessário, a amostra era diluída 1:10. O branco foi determinado pela leitura de 10 µL de água em 200 µL do reagente de Bradford. A absorbância das soluções-padrão, das amostras e do branco foram avaliadas em triplicata. A leitura foi feita em espectrofotômetro leitor de microplacas Epoch (BioTek, Winooski, VT, EUA) a 595 nm para determinar a concentração proteica. Os valores de absorbância de cada amostra e das soluções de referência foram subtraídos pela média das absorbâncias do branco. O resultado foi calculado pela equação da reta gerada por uma regressão linear dos pontos obtidos das leituras dos poços contendo as soluções de BSA da curva-padrão nas concentrações de 2 mg/mL – 0,03125 mg/mL. Esses pontos que formaram essa curva foram definidos pelas médias dos valores em triplicata de absorbância que foram plotadas no eixo X e suas respectivas concentrações conhecidas de proteína no eixo Y. A partir da função dessa curva, a concentração de proteínas nas amostras foi calculada e expressa em mg de proteína/mL ou µg de proteína/µL.

6.11.3 Western Blotting

As amostras foram então tratadas com tampão Laemmli, aquecidas a 99-100 °C e quantidade equivalente de proteína por amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) por 2 h a 100 V e 4 °C em tanques próprios. Essas câmaras de eletroforese foram montadas a partir de um aparelho específico que consiste em um cassete para encaixe de mini gel (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) que foi acoplado em cubas contendo tampão de eletroforese constituído por Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS a 0,1% em pH 8,4. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,22 µm para proteínas de baixo peso molecular ou para membranas de nitrocelulose de 0,45 µm para proteínas de alto peso molecular. A transferência foi feita eletricamente em cassetes sanduíches para gel e membrana (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Os géis e as membranas foram posicionados entre dois papéis de filtro e uma esponja de fibra colocados em cada uma de ambas as extremidades laterais interiores do cassete sanduíche. Os cassetes foram então encaixados no interior de um

aparelho para transferência, que por sua vez foi acoplado nas cubas. A transferência ocorreu durante 1 h a 100 V e 4 °C em cubas preenchidas com tampão de transferência constituído por Tris 25 mM, glicina 192 mM e 20% de metanol em pH 8,4, consistindo na câmara de transferência. Os sítios inespecíficos da membrana foram bloqueados por 1 h, em temperatura ambiente e agitação orbital horizontal, com uma solução de BSA a 4%, diluída em tampão tris-salina contendo Tween 20 (*Tris Buffer Saline-Tween 20*, TBS-T). As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários. Para remover o excesso de anticorpo primário não ligado, as membranas foram colocadas em temperatura ambiente e lavadas três vezes com TBS-T por agitação orbital horizontal de 5 ou 10 min para cada lavagem. Os anticorpos secundários conjugados com enzima foram incubados em temperatura ambiente durante 1 h e 30 min. O excesso de anticorpo secundário não ligado foi removido lavando-se as membranas cinco vezes com TBS-T por agitação orbital horizontal de 5 ou 10 min para cada lavagem. Os anticorpos primários e secundários utilizados e suas respectivas diluições e marcas estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 1 – Anticorpos usados nos ensaios de Western Blotting.

Anticorpo primário	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição	Marca do anticorpo primário
Anti-O-GlcNAc	1:3.000	IgG Anti-camundongo	1:10.000	Sigma-Aldrich O7764
Anti-OGT	1:500	IgG Anti-cabra	1:3 000	Sigma-Aldrich SAB2500715
Anti-OGA	1:1.000	IgG Anti-coelho	1:10.000	Sigma-Aldrich SAB4200311
Anti-fosfo-eNOS Ser 1177	1:500	IgG Anti-coelho	1:4.000	Cell Signaling Technology 9571S
Anti-eNOS total	1:1.000	IgG Anti-camundongo	1:4.000	Abcam ab76198
Anti-NOX4	1:500	IgG Anti-coelho	1: 4.000	Santa Cruz Biotechnology sc-30141
Anti-β-actina	1:1.000	IgG Anti-coelho	1:7.500	Cell Signaling Technology 4967L

A visualização das bandas foi obtida após a reação com substrato quimioluminescente para peroxidase *LuminataTM Forte ECL Western HRP Substrate* (Millipore, Billerica, MA, EUA) e a captura da imagem realizada em fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Os sinais captados via quimioluminescência foram quantificados densitometricamente usando o *software* de análise de imagens ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) e os resultados foram expressos em relação aos níveis do respectivo controle (fold-change). As membranas foram deblotadas com *RestoreTM Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a temperatura ambiente por 45 min em agitação orbital horizontal para reutilização a fim de marcar o normalizador/*housekeeping* e outras proteínas de interesse se fosse o caso.

Para normalizar, inicialmente calculou-se a média das razões entre os valores da densidade ótica da proteína alvo das amostras controle pelos valores da densidade ótica do normalizador/*housekeeping* da amostra controle respectiva e esse valor foi igualado a 1. Todas as razões entre os valores da densidade ótica da proteína alvo e de densidade ótica do normalizador/*housekeeping* respectivo tanto de amostras controle quanto de amostras testes foram então divididos pela média igualada a 1 calculada anteriormente para obter valores relativos.

6.12 Dosagem de citocinas

Para avaliar a concentração tecidual de citocinas foi realizado um ensaio de imunoabsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Essa quantificação baseia-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. A obtenção do extrato proteico de tecido foi realizada conforme descrito acima, com a diferença de ter sido utilizado PBS como diluente ao invés de água ultrapurificada. Os tecidos avaliados consistiram na gordura epididimal e no tecido adiposo perivascular de aorta torácica.

A quantificação das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foi feita em placas de 96 poços através de kits comerciais DuoSet® ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) conforme descrito pelo fabricante. Para a dosagem de cada uma das três citocinas avaliadas utilizou-se uma placa de 96 poços diferente. Os anticorpos de captura específicos de cada citocina foram diluídos separadamente numa concentração de 800 ng/mL em PBS. Foram adicionados 50 μ L por poço dessas soluções contendo os anticorpos de captura anti-TNF- α de camundongo, anti-IL-6 de camundongo ou anti-IL-10 de camundongo em cada placa correspondente. Logo em seguida, realizou-se uma incubação *overnight* à 4 °C.

Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem constituído de PBS com Tween 20 0,05%. As ligações não específicas foram bloqueadas com 100 µL de PBS acrescido de 1% de BSA por 2 h, em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com tampão de lavagem. Depois disso, foram pipetados 50 µL das amostras por poço. Para a confecção da curva-padrão, esse mesmo volume das diferentes concentrações das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram pipetados por poço em cada placa correspondente. O ensaio seguiu-se com incubação *overnight* à 4 °C.

Após esse período, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem. Os anticorpos de detecção biotinilados específicos para cada citocina (anti-TNF- α de camundongo, anti-IL-6 de camundongo ou anti-IL-10 de camundongo) foram diluídos separadamente na concentração de 4 ng/mL em PBS contendo 1% de BSA e 50 µL dessas soluções foram adicionados em cada poço correspondente. Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, três novas lavagens da placa foram feitas com tampão próprio. Depois, 50 µL do conjugado estreptoavidina-peroxidase diluídos 1:40 em PBS contendo BSA 1% foram adicionados em cada poço. Decorridos 30 min de incubação à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas três vezes com tampão de lavagem. Em seguida, 50 µL do substrato cromogênico tetrametilbenzidina 1 mg/mL acrescido de 0,06% de H₂O₂ foram colocados em cada poço. Após incubação de 15 min à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pipetando-se 50 µL de ácido sulfúrico 1 N aos poços. A densidade ótica foi aferida à 450 nm em espectrofotômetro FlexStation® 3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Os resultados foram obtidos a partir da equação da curva gerada pela aplicação de regressão logística de 4 parâmetros dos pontos obtidos das leituras dos poços contendo a curva-padrão. Esses pontos que formaram essa curva foram definidos pelos valores de absorbância que foram plotados no eixo X e suas respectivas concentrações conhecidas de citocina no eixo Y. A partir da função dessa curva, a concentração de citocinas nas amostras foi calculada. Como esse resultado era dependente da quantidade de tecido presente nos volumes fixos e pré-definidos de cada amostra que foram aplicados nos poços durante o ensaio, foi executada uma normalização em que os valores finais da quantificação de citocinas foram corrigidos e então expressos em pg/mg de tecido.

Nesse ensaio, quanto maior é a concentração do antígeno na amostra, no caso as citocinas, maior será o número de ligações aos anticorpos de captura e, por consequência, dos anticorpos de detecção biotinilados e da ligação do conjugado estreptoavidina-peroxidase à biotina desses anticorpos. Uma maior concentração de peroxidase no poço gera assim uma densidade ótica mais intensa após a adição do substrato cromogênico. Sendo assim, a concentração é diretamente proporcional à densidade ótica.

6.13 Método de Griess

A técnica de Griess é um método colorimétrico baseado na reação de Griess para mensuração de nitrito e nitrato (NO_x), que por sua vez são metabólitos do NO, cuja meia-vida curta torna difícil sua determinação direta. Dessa forma, esse procedimento espectrofotométrico pode ser usado na avaliação da produção de NO por quantificação desses compostos. Tal inferência pode ser feita também pela quantificação de nitrito isoladamente. Brevemente o ácido sulfanílico reage com o nitrito da amostra formando um sal diazônio que, por sua vez, reage com o dicloridrato de *N*-(1-naftil)-etilenodiamina formando um produto colorido que pode ser quantificado por espectrofotometria.

Foram misturados volumes iguais de dicloridrato de *N*-(1-naftil)-etilenodiamina e ácido sulfanílico para formar o reagente de Griess em quantidade suficiente para o ensaio. Para calibração, foram preparadas soluções padrão de nitrito na concentração de 1 µM – 100 µM a partir da diluição seriada em água de uma solução estoque de nitrito de sódio 1 mM. Em placas de 96 poços, 150 µL da amostra ou das soluções de curva-padrão preparadas anteriormente foram pipetados nos poços da placa. Em seguida, nesses mesmos poços foram pipetados 20 µL do reagente de Griess e 130 µL de água. O branco foi preparado com 20 µL do reagente de Griess, aos quais foram adicionados 280 µL de água. A placa foi submetida a agitação orbital horizontal por 10 min e depois incubada à temperatura ambiente por 30 min. A leitura foi feita em espectrofotômetro leitor de microplacas Epoch (BioTek, Winooski, VT, EUA) a 548 nm. O resultado foi calculado pela equação da reta gerada por uma regressão linear dos pontos obtidos das leituras dos poços contendo as soluções de nitrito de sódio da curva-padrão nas concentrações de 1 µM – 100 µM. Esses pontos que formaram essa curva foram definidos pelos valores de absorbância que foram plotados no eixo X e suas respectivas concentrações conhecidas de nitrito no eixo Y. A partir da função dessa curva, a concentração de nitrito nas amostras foi calculada e expressa em µM.

6.14 Avaliação da geração de O₂^{•-}

Esse ensaio é derivado do postulado do papel de radicais livres indefinidos na luminescência de compostos da família das acridinas. Foi então descrito o envolvimento da lucigenina, o nitrato de bis-*N*-metilacridina, e do O₂^{•-} no processo de luminescência. A química do processo envolve a geração de um intermediário cujo rendimento de sua decomposição é um derivado da acridina eletronicamente excitado que logo retorna a um estado basal não-excitado. Esse fenômeno é decorrente da perda de energia pelos elétrons e seu retorno a uma órbita mais

interna promovendo emissão de fóton (Totter *et al.*, 1960a; Totter *et al.*, 1960b; Greenlee *et al.*, 1962; Faulkner & Fridovich, 1993).

O ensaio da lucigenina baseia-se então na geração de luz a partir da reação desse composto com o $O_2^{\cdot -}$ produzido a partir da conversão enzimática do substrato NAD(P)H pelas NOX. Nesse experimento, as amostras empregadas consistiram em lisado de células estimuladas obtido conforme descrito anteriormente. O ensaio foi realizado com 50 μ L de amostra e os seguintes reagentes com suas respectivas concentrações finais: 75 μ L de lucigenina (5 μ M), 25 μ L de NAD(P)H (0,1 mM) e 100 μ L de solução do tampão de trabalho constituído pelos seguintes reagentes em suas concentrações estoque: ácido egtázico (EGTA) 1 mM, KH_2PO_4 50 mM e sacarose 150 mM, pH 7,4. Devido à fotossensibilidade da lucigenina, para evitar qualquer viés, a reação foi realizada no escuro e rapidamente. A luminescência foi medida por 30 ciclos de 18 seg cada por um luminômetro de microplacas Orion II (Titertek Berthold, Alemanha). Leituras basais foram feitas anteriormente à adição do NAD(P)H. Esses valores foram subtraídos da luminescência obtida a partir da posterior adição NAD(P)H. A geração de $O_2^{\cdot -}$ foi expressa como unidades relativas de luminescência (URL)/mg proteína.

6.15 Determinação da produção de NO *in vitro* por fluorimetria de diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA)

Células foram cultivadas e estimuladas com LPC e/ou Thiamet G em placas de 96 poços (3×10^4 células/poço). Células incubadas com serotonina (5-HT) foram usadas como controle positivo, enquanto que a incubação concomitante de 5-HT com N(ω)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo de óxido nítrico sintase, foi empregada como controle negativo. Ao final do estímulo, as células foram incubadas com DAF-2 DA 2,5 μ M por 30 min e depois os poços foram lavados duas vezes com PBS. A leitura da placa foi feita com cada poço preenchido com 150 μ L desse tampão. A análise foi feita por fluorimetria em aparelho Flexstation® 3 (Molecular Devices, San José, CA, EUA) no comprimento de onda de excitação em 491 nm e de emissão em 513 nm. Para se obter um branco, foi realizada uma leitura nos poços sem células em que houve adição apenas do DAF-2 DA. A média desses valores do branco foram descontadas dos resultados das outras leituras e que foram expressos por intensidade de fluorescência/mg de proteína.

6.16 Avaliação da geração de EROs *in vitro* por fluorimetria de DHE

Células foram cultivadas e estimuladas com LPC e/ou Thiamet G em placas de 96 poços (3×10^4 células/poço). Células incubadas com Ang II foram usadas como controle positivo,

enquanto que a incubação concomitante de Ang II com Tiron, um antioxidante e sequestrador de $O_2^{\cdot-}$, foi empregada como controle negativo. Ao final do estímulo, as células foram incubadas com DHE 2,5 μ M por 30 min e depois os poços foram lavados duas vezes com PBS. A leitura da placa foi feita com cada poço preenchido com 150 μ L desse tampão. A análise foi feita por fluorimetria em aparelho Flexstation® 3 (Molecular Devices, San José, CA, EUA) no comprimento de onda de excitação em 365 nm e de emissão em 420 nm. Para se obter um branco, foi realizada uma leitura nos poços sem células em que houve adição apenas do DHE. A média desses valores do branco foram descontadas dos resultados das outras leituras e que foram expressos por intensidade de fluorescência/mg de proteína.

6.17 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). O nível de significância mínima aceitável foi $p < 0,05$. A diferença entre os valores médios foi avaliada estatisticamente pelo teste t de Student ou pelo teste de análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*), seguido do pós-teste de Tukey. Em resultados de reatividade vascular, as curvas concentração-efeito individuais foram ajustadas usando a função $Y = \text{Fundo} + [(\text{Topo} - \text{Fundo}) / (1 + 10^{(\text{Log EC50} - X)})]$ e plotadas em uma curva sigmoidal por análise de regressão não linear, onde X é o logaritmo da concentração das drogas, Y é a resposta contrátil ou relaxante e EC50 é a concentração em que o composto induz 50% do efeito máximo, o Emax. Os parâmetros calculados foram a potência do agonista e a resposta máxima que são expressas como o valor de pD_2 (logaritmo negativo dos valores de EC50 – concentração que produz 50% da resposta máxima) e a Rmax (máximo efeito produzido pelo agonista), respectivamente. O programa Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San. Diego, CA, USA) foi utilizado para analisar estes parâmetros.

Resultados

7. Resultados

7.1 Experimentos *in vivo* e *ex vivo*

7.1.1 Animais ApoE^{-/-} (western) apresentam maior ganho de massa corporal em relação aos camundongos WT (chow)

Não foram observadas diferenças na massa corporal inicial, avaliada em camundongos de 15 semanas, entre animais WT (chow) e camundongos ApoE^{-/-} (western) (Figura 1A). O ganho de massa corporal foi obtido pela variação de massa entre a 15ª e a 23ª semanas. Em camundongos ApoE^{-/-} (western), esse intervalo coincide com o período no qual os animais receberam a dieta hipercolesterolêmica e o final do protocolo experimental, com a realização da eutanásia. No entanto, diferente da massa corporal inicial, houve diferença significativa no ganho da massa corporal entre os animais WT (chow) e ApoE^{-/-} (western), sendo o mesmo maior nesse último grupo (Figura 1C). Da mesma forma, a massa corporal final, obtida em camundongos com 23 semanas, foi estatisticamente diferente (Figura 1B), refletindo maior ganho de massa corporal pelos animais ApoE^{-/-} (western) no período de 8 semanas.

Figura 5 – Massa corporal de camundongos WT tratados com veículo e ApoE^{-/-} tratados com veículo ou Thiamet G. Os gráficos demonstram (A) a massa corporal inicial (15 semanas), (B) a massa corporal final (23 semanas), e (C) o ganho de massa corporal (entre 15 e 23 semanas) em camundongos WT tratados com veículo e ApoE^{-/-} tratados com veículo ou Thiamet G. * $p < 0,05$ WT (chow) + Veículo vs. ApoE^{-/-} (western) + Veículo (*two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey).

7.1.2 O tratamento com Thiamet G não altera a evolução ponderal dos camundongos ApoE^{-/-} (western)

O ganho de massa corporal em camundongos ApoE^{-/-} (western) (Figura 1C) não foi afetado pelo tratamento com Thiamet G por 3 semanas. Desse modo, não houve diferença estatística significativa na massa corporal final de animais ApoE^{-/-} (western) que receberam veículo ou Thiamet G (Figura 1B).

7.1.3 Camundongos ApoE^{-/-} (western) apresentam perfil dislipidêmico

A avaliação do perfil lipídico dos animais demonstrou que a concentração sérica de colesterol total, triglicerídeos, colesterol VLDL e colesterol LDL em animais ApoE^{-/-} (western) tratados com veículo foi significativamente maior que a dos animais WT (chow) tratados com veículo. Além disso, não houve diferença significativa nas concentrações séricas de colesterol HDL e glicose (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos de animais WT (chow) e ApoE^{-/-} (western) tratados com Thiamet G ou veículo.

Parâmetros	WT (chow)	ApoE ^{-/-} (western)	
	Veículo	Veículo	Thiamet G
Colesterol total (mg/dL)	98,30 ± 6,78	1690,00 ± 113,00*	1473,00 ± 129,90
Colesterol HDL (mg/dL)	2,46 ± 0,89	3,56 ± 0,84	2,95 ± 0,74
Triglicerídeos (mg/dL)	77,26 ± 11,57	295,20 ± 41,03*	290,80 ± 79,84
Colesterol VLDL (mg/dL)	12,98 ± 3,11	61,49 ± 7,88*	58,17 ± 15,97
Colesterol LDL (mg/dL)	72,11 ± 5,82	1617,00 ± 107,70*	1412,00 ± 113,60
Glicose (mg/dL)	126,40 ± 7,77	202,10 ± 10,82	212,30 ± 26,56

Dados expressos como média ± E.P.M. * p<0,05 WT (chow) + Veículo vs. ApoE^{-/-} (western) + Veículo (two-way ANOVA com pós-teste de Tukey). n = 3-12.

7.1.4 Thiamet G não altera as concentrações séricas de lipídeos ou glicose dos animais

A avaliação bioquímica do perfil lipídico sérico demonstrou que a administração de Thiamet G por 3 semanas não alterou os parâmetros lipídicos de animais ApoE^{-/-} (western) em

relação aos tratados com veículo. O tratamento com Thiamet G também não alterou a concentração sérica de glicose (Tabela 2).

7.1.5 Camundongos ApoE^{-/-} (western) apresentam formação de placas ateroscleróticas no arco aórtico

A análise histomorfológica de lâminas coradas com HE revela que animais ApoE^{-/-} (western) recebendo a dieta rica em colesterol por oito semanas apresentaram placas ateroscleróticas no arco aórtico, mas esse evento não foi observado em animais WT (western) (Figura 6).

Figura 6 – Secções transversais de arco aórtico de animais WT (western) e ApoE^{-/-} (western) corados com HE. A imagem mostra a presença de placa aterosclerótica no corte transversal do arco aórtico de animal ApoE^{-/-} (western). n = 5-8.

7.1.6 Há aumento da expressão gênica da enzima NOX4 em região de placa aterosclerótica

O estresse oxidativo é um importante marcador de disfunção endotelial e está presente em placas ateroscleróticas. A avaliação da expressão gênica por qRT-PCR demonstrou valor significativamente maior de RNAm para a enzima oxidante NOX4 em região de placa, conforme observado nos arcos aórticos de camundongos ApoE^{-/-} (western), em comparação à aorta torácica desses mesmos animais (Figura 7A). No entanto, nessa condição não houve alteração na expressão de RNAm da enzima antioxidante SOD1 em região de placa (Figura 7B).

Figura 7 – Expressão gênica de enzimas do sistema redox. Gráfico de barras demonstram a expressão de RNAm, avaliada por qRT-PCR, para (A) NOX4 e (B) SOD1 no arco aórtico e aorta torácica de animais ApoE^{-/-} (western). * $p < 0,05$ ApoE^{-/-} (western) aorta torácica vs. ApoE^{-/-} (western) arco aórtico (teste t de Student).

7.1.7 Camundongos ApoE^{-/-} (western) exibem estresse oxidativo no arco aórtico

Considerando que no arco aórtico de animais ApoE^{-/-} (western) foram observadas placas e maior expressão de NOX4, avaliamos o estresse oxidativo nessas mesmas regiões vasculares em camundongos WT (western) e ApoE^{-/-} (western), ou seja, animais com a mesma dieta. Observamos aumento de EROs no arco aórtico de camundongos ApoE^{-/-} (western), em relação aos animais sem placa WT (western), como demonstrado pela fluorescência por DHE. Logo, o estresse oxidativo nessa região é maior em animais ApoE^{-/-} (western) (Figuras 8A e 8B) e não está relacionado a efeitos da dieta hipercolesterolêmica *per se*, mas sim à presença de processo aterosclerótico.

Figura 8 – Emissão de fluorescência por DHE no arco aórtico de camundongos WT (western) e ApoE^{-/-} (western). (A) Secções transversais de arco aórtico marcadas com sonda DHE para detecção de EROs. (B) Gráfico de barras demonstram a intensidade de fluorescência por DHE em camundongos WT (western) e ApoE^{-/-} (western). * $p < 0,05$ WT (western) vs. ApoE^{-/-} (western) (teste t de Student).

7.1.8 Camundongos ApoE^{-/-} (western) tendem a apresentar um perfil inflamatório maior em relação a animais WT (chow) no que se refere à produção de citocinas inflamatórias

A concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Figuras 9A e 9D) e IL-6 (Figuras 9B e 9E) e da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figuras 9C e 9F) foi determinada por ELISA na gordura epididimal (Figuras 9A, 9B e 9C) e no tecido adiposo perivascular de aorta torácica (Figuras 9D, 9E e 9F) de animais WT (chow) e camundongos ApoE^{-/-} (western). Os resultados demonstram que a produção de TNF- α na gordura epididimal de animais ApoE^{-/-} (western) foi maior em comparação aos níveis detectados nesse tecido em camundongos WT (chow) (Figura 9A), mas não houve alteração significativa na concentração de IL-6 (Figura 9B) ou IL-10 (Figura 9C) neste mesmo tecido, ou seja, diferentemente do que acontece com os níveis de TNF- α na gordura epididimal, as dosagens das outras duas citocinas nos camundongos ApoE^{-/-} (western) não foram diferentes estatisticamente dos valores obtidos nos animais WT (chow). Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações destas citocinas no tecido adiposo perivascular da aorta torácica entre camundongos WT (chow) e ApoE^{-/-} (western) (Figuras 9D, 9E e 9F).

Figura 9 – Dosagens de citocinas na gordura epididimal e no tecido adiposo perivascular da aorta torácica de animais WT (chow) e ApoE^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G. Gráficos referentes às dosagens das citocinas TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) na gordura epididimal de camundongos WT (chow) e ApoE^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G e referentes às dosagens das respectivas citocinas (D, E e F) no tecido adiposo perivascular de aorta torácica dos mesmos animais. * $p < 0,05$ WT (chow) + Veículo vs. ApoE^{-/-} (western) + Veículo, # $p < 0,05$ ApoE^{-/-} (western) + Veículo vs. ApoE^{-/-} (western) + Thiamet G (*two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey).

7.1.9 Thiamet G reduz a produção de TNF- α na gordura epididimal de animais ApoE^{-/-} (western)

O tratamento com Thiamet G foi utilizado para avaliar os efeitos do aumento de *O*-GlcNAc na produção de citocinas inflamatórias. Como mencionado anteriormente, animais ApoE^{-/-} (western) apresentaram aumento de TNF- α na gordura epididimal, em relação aos camundongos controle WT (chow). O tratamento com Thiamet G reduziu os níveis de TNF- α

nesse tecido (Figura 9A). Além disso, Thiamet G não alterou o perfil secretório das outras citocinas tanto no mesmo tecido adiposo epididimal quanto no tecido adiposo perivascular da aorta torácica (Figuras 9B, 9C, 9D, 9E e 9F).

7.1.10 Há aumento de expressão gênica vascular das enzimas que regulam a modificação por *O*-GlcNAc em região de estresse de cisalhamento turbilhonado

Após caracterização de elementos do modelo animal de aterosclerose, como a formação das placas propriamente ditas, aumento de massa corporal, dislipidemias e presença de processos inflamatório e oxidativo, o próximo passo consistiu em avaliar o comportamento dos componentes responsáveis pela modificação por *O*-GlcNAc. Os participantes chave, nesse caso, são as enzimas OGT e OGA, cuja expressão gênica foi avaliada por qRT-PCR. A expressão de RNAm das enzimas OGT (Figura 10A) e OGA (Figura 10B) foi significativamente maior no arco aórtico em comparação à aorta torácica em animais ApoE^{-/-} (western).

Figura 10 – Expressão gênica das enzimas reguladoras da modificação por *O*-GlcNAc. Gráfico de barras mostrando expressão do RNAm, avaliada por qRT-PCR, para (A) OGT e (B) OGA no arco aórtico e aorta torácica de camundongos ApoE^{-/-}. * p<0,05 ApoE^{-/-} (western) aorta torácica vs. ApoE^{-/-} (western) arco aórtico (teste t de Student).

7.1.11 A expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc é maior em arco aórtico contendo placas ateroscleróticas

Para verificar se a alteração na homeostasia da modificação por *O*-GlcNAc é devido à presença de placa ou por alterações no estresse de cisalhamento, foi realizado Western Blotting

do arco aórtico, comparando essa mesma região em animais ApoE^{-/-} (western), que possuem placa, e em animais WT (western), sem placa. Foi então confirmado aumento de *O*-GlcNAc no arco aórtico de animais ApoE^{-/-} (western) em relação a camundongos WT (chow) (Figuras 11A e 11B).

Figura 11 – Expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc em arco aórtico de camundongos WT (western) e ApoE^{-/-} (western) determinada por Western Blotting. (A) Imagem representativa da expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. (B) Gráfico de barras relativo à expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. * p<0,05 arco aórtico WT (western) vs. arco aórtico ApoE^{-/-} (western) (teste t de Student).

7.1.12 Há maior expressão proteica das enzimas reguladoras da modificação por *O*-GlcNAc em arco aórtico contendo placas ateroscleróticas

A expressão proteica de OGT (Figuras 12A e 12B) e OGA (Figuras 12A e 12C) também foi maior no arco aórtico de camundongos ApoE^{-/-} (western) em relação ao arco aórtico de camundongos WT (western), confirmando que a superexpressão de componentes da *O*-GlcNAc é, de fato, maior em regiões de placa e não somente relacionada a diferenças no estresse de cisalhamento.

Figura 12 – Expressão proteica das enzimas reguladoras da O-GlcNAc em arco aórtico de camundongos WT (western) e ApoE^{-/-} (western) determinada por Western Blotting. (A) Imagem representativa da expressão proteica de OGT e OGA. Imagens adquiridas da mesma membrana após *stripping* seguida de marcação com o outro anticorpo. (B) Gráfico de barras relativo à expressão de OGT. (C) Gráfico de barras relativo à expressão de OGA. * $p < 0,05$ arco aórtico WT (western) vs. arco aórtico ApoE^{-/-} (western) (teste t de Student).

7.1.13 Animais ApoE^{-/-} (western) apresentam disfunção endotelial e o tratamento com Thiamet G não interfere nessa resposta

A função vascular de camundongos WT (chow) e ApoE^{-/-} (western) foi determinada. Em relação ao controle, os animais ApoE^{-/-} (western) + Veículo apresentaram prejuízo no relaxamento dependente de endotélio. Foi avaliado também se o tratamento *in vivo* desses animais ApoE^{-/-} (western) com Thiamet G alteraria essa característica e observou-se que, apesar de não exacerbar a disfunção endotelial, a droga também não restaurou a resposta vasodilatadora à ACh (Figura 13).

Figura 13 – Curvas concentração-resposta para ACh em aortas torácicas de camundongos WT (chow) e ApoE^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G. n = 3-4. * p<0,05 WT (chow) + Veículo vs. ApoE^{-/-} (western) + Veículo (*two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey). n = 3-4.

7.1.14 Em camundongos ApoE^{-/-} (western), as respostas à PE e ao NPS não estão alteradas

Além disso, camundongos ApoE^{-/-} (western) não apresentaram mudanças nas respostas vasoconstritoras à PE (Figura 14) e vasodilatadoras ao NPS (Figura 15). Nesses casos, o tratamento com Thiamet G também não modificou esses parâmetros (Figuras 14 e 15). Os efeitos do tratamento *in vivo* com Thiamet G sobre os valores de Rmax e pD2 nas curvas concentração-resposta para ACh, PE e NPS são demonstrados, respectivamente, nas tabelas 3 e 4.

Figura 14 – Curvas concentração-resposta para PE em aortas torácicas de camundongos WT (chow) e ApoE^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G. n = 3-4.

Figura 15 – Curvas concentração-resposta para NPS em aortas torácicas de camundongos WT (chow) e ApoE^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G. n = 3-4.

Tabela 3 – Valores de Rmax para PE, ACh e NPS em aortas torácicas provenientes de camundongos WT e ApoE^{-/-} tratados com Thiamet G ou veículo.

	Rmax		
	WT + Veículo	ApoE ^{-/-} + Veículo	ApoE ^{-/-} + Thiamet G
ACh	92,29 ± 2,74	77,25 ± 1,34	82,58 ± 1,01
PE	116,40 ± 3,25	115,40 ± 4,54	108,20 ± 6,29
NPS	98,11 ± 1,64	94,20 ± 2,67	98,80 ± 1,08

Dados expressos como média ± E.P.M. n = 3-4.

Tabela 4 – Valores de pD2 para PE, ACh e NPS em aortas torácicas provenientes de camundongos WT e ApoE^{-/-} tratados com Thiamet G ou veículo.

	pD2		
	WT + Veículo	ApoE ^{-/-} + Veículo	ApoE ^{-/-} + Thiamet G
ACh	6,66 ± 0,07	6,94 ± 0,04	6,91 ± 0,03
PE	7,11 ± 0,07	6,69 ± 0,10	6,80 ± 0,13
NPS	7,99 ± 0,06	8,06 ± 0,11	8,26 ± 0,05

Dados expressos como média ± E.P.M. n = 3-4.

7.1.15 LPC diminui a resposta vasodilatadora à ACh e o Thiamet G tende a piorar esse relaxamento dependente de endotélio

Considerando que a LPC é um dos lipídeos que compõe a oxLDL e seu conteúdo aumenta devido a oxidação dessa lipoproteína e baseados nos resultados anteriores, realizamos outro protocolo de reatividade vascular. Para avaliar se a disfunção vascular observada nos animais ApoE^{-/-} (western) é induzida por lipídeos circulantes como a LPC, bem como verificar se nesse caso a disfunção é alterada pelo aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc, as aortas torácicas de animais WT de 15 semanas em dieta *standard chow* foram incubadas com veículo ou LPC na presença de Thiamet G ou seu veículo. Esse protocolo permitiu avaliar os efeitos *in vitro* do tratamento com Thiamet G nas respostas vasculares induzidas pela LPC. A LPC induziu disfunção endotelial, caracterizada pela redução da resposta vasodilatadora à ACh. Thiamet G tendeu a acentuar essa disfunção. Na ausência de LPC, Thiamet G alterou de modo

semelhante a resposta a ACh, comparativamente ao observado em presença de LPC. Logo, o Thiamet G foi mais impactante que a LPC ao induzir disfunção endotelial (Figura 16).

Figura 16 – Curvas concentração-resposta para ACh em aortas torácicas de camundongos WT incubadas com veículo ou LPC na presença de veículo ou Thiamet G. * $p < 0,05$ controle + veículo vs. LPC + veículo, # $p < 0,05$ controle + veículo vs. controle + Thiamet G e LPC + Thiamet G (two-way ANOVA com pós-teste de Tukey). $n = 3-4$.

7.1.16 LPC não modifica a resposta à PE ou NPS e Thiamet G não altera esses parâmetros

A incubação de aortas com LPC não alterou a resposta vasoconstritora à PE (Figura 17) ou a resposta vasodilatadora ao NPS (Figura 18). Além disso, a incubação com Thiamet G não afetou essas respostas em nenhum dos casos (Figuras 17 e 18). Os efeitos da LPC e do Thiamet G sobre os valores de R_{max} e pD_2 nas curvas concentração-resposta para ACh, PE e NPS são demonstrados, respectivamente, nas tabelas 5 e 6.

Figura 17 – Curvas concentração-resposta para PE em aortas torácicas de camundongos WT incubadas com veículo ou LPC na presença de veículo ou Thiamet G. $n = 3-4$.

Figura 18 – Curvas concentração-resposta para NPS em aortas torácicas de camundongos WT incubadas com veículo ou LPC na presença de veículo ou Thiamet G. $n = 3-4$.

Tabela 5 – Valores de Rmax para PE, ACh e NPS em aortas torácicas provenientes de camundongos WT incubadas com LPC na presença de veículo ou Thiamet G.

	Rmax			
	Controle + Veículo	Controle + Thiamet G	LPC + Veículo	LPC + Thiamet G
ACh	68,26 ± 4,52	29,10 ± 4,69	44,27 ± 2,05	29,71 ± 1,25
PE	142,90 ± 4,58	127,80 ± 4,12	125,20 ± 4,07	130,00 ± 3,79
NPS	96,14 ± 2,05	88,56 ± 1,41	93,81 ± 2,12	95,92 ± 2,87

Dados expressos como média ± E.P.M. n = 3-4.

Tabela 6 – Valores de pD2 para PE, ACh e NPS em aortas torácicas provenientes de camundongos WT incubadas com LPC na presença de veículo ou Thiamet G.

	pD2			
	Controle + Veículo	Controle + Thiamet G	LPC + Veículo	LPC + Thiamet G
ACh	6,34 ± 0,14	6,08 ± 0,34	6,15 ± 0,09	6,15 ± 0,08
PE	7,02 ± 0,08	7,14 ± 0,09	7,22 ± 0,09	7,01 ± 0,08
NPS	7,82 ± 0,08	7,48 ± 0,05	8,10 ± 0,11	7,92 ± 0,13

Dados expressos como média ± E.P.M. n = 3-4.

7.1.17 O tratamento com Thiamet G atenua a concentração sérica de nitrito

A fim de avaliar a produção de NO, analisamos a concentração sérica de um dos seus metabólitos. Em animais ApoE^{-/-} (western) a concentração de nitrito foi maior que em camundongos WT (chow). O tratamento desses animais ApoE^{-/-} (western) com Thiamet G reduziu a concentração de nitrito (Figura 19).

Figura 19 – Concentração sérica de nitrito em animais WT (chow) e ApoE^{-/-} (western) tratados com veículo ou Thiamet G. * p<0,05 WT (chow) + Veículo vs. ApoE^{-/-} (western) + Veículo, # p<0,05 ApoE^{-/-} (western) + Veículo vs. ApoE^{-/-} (western) + Thiamet G (*two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey).

7.2 Experimentos *in vitro*

7.2.1 LPC aumenta O₂^{•-} em células endoteliais

Células endoteliais estimuladas com LPC 10⁻⁵ M por 24 h exibiram, em relação a seu respectivo controle, significativo aumento da geração de O₂^{•-}, estimado pela luminescência a lucigenina (Figura 20B). Contudo, o mesmo efeito não foi observado com o mesmo estímulo no tempo de 6 h (Figura 20A). Dessa forma, foi definido o tempo de 24 h para os estímulos com LPC 10⁻⁵ M nos ensaios posteriores.

Figura 20 – Geração de O₂^{•-} induzida por LPC estimada pelo ensaio de lucigenina em células endoteliais. (A) URL em células endoteliais estimuladas por LPC 10⁻⁵ M durante 6 h e respectivo controle. (B) URL em células endoteliais estimuladas por LPC 10⁻⁵ M durante 24 h e respectivo controle. * p<0,05 controle vs. LPC (teste t de Student).

7.2.2 O Thiamet G na concentração de 10^{-6} M induz aumento de *O*-GlcNAc em células endoteliais

Para garantir que a concentração de Thiamet G utilizada para aumentar os níveis de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc era eficaz, as células endoteliais foram estimuladas com Thiamet G 10^{-6} M por 24 h. Houve aumento significativo de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc em células na presença de Thiamet G em relação a células na presença de veículo (Figuras 21A e 21B).

7.2.3 LPC não altera a expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc em células endoteliais

Avaliamos o padrão geral de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc em células endoteliais estimuladas com LPC para determinar a participação de lipídeos aterogênicos nessa modificação pós-traducional. O estímulo de células endoteliais apenas com LPC 10^{-5} M durante 24 h, na ausência de Thiamet G, não alterou o padrão global de modificação de proteínas por *O*-GlcNAc (Figuras 21A e 21B).

7.2.4 LPC intensifica o aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc induzido por Thiamet G

Isoladamente, LPC não alterou o padrão global de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. Thiamet G aumentou a expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, o que, por sua vez, foi intensificado na presença de LPC (Figuras 21A e 21B), ou seja, no estímulo concomitante de LPC e Thiamet G por 24 h, LPC potencializou a quantidade de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, apesar de isoladamente, LPC não alterar a modificação de proteínas por *O*-GlcNAc.

A

B

Figura 21 – Expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc determinada por Western Blotting em células endoteliais estimuladas com LPC 10^{-5} M ou PBS [controle (C)] por 24 h na presença de veículo ou Thiamet G. (A) Imagem representativa da expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. (B) Gráfico de barras relativo à expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. * $p < 0,05$ controle na presença de veículo vs. controle na presença de Thiamet G, # $p < 0,05$ controle na presença de Thiamet G vs. LPC na presença de Thiamet G (*two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey).

7.2.5 LPC diminui a produção basal de NO em células endoteliais

A fim de determinar mecanismos pelos quais os lipídeos aterogênicos alteram parâmetros fisiológicos importantes em células vasculares, avaliamos o efeito da incubação de células endoteliais com LPC na produção de NO. Em células endoteliais, a LPC reduziu a produção basal de NO. O controle positivo do experimento foi feito com 5-HT 10^{-6} M observando-se aumento intenso da produção de NO. O controle negativo, por sua vez, foi realizado com a 5-HT 10^{-6} M na presença da L-NAME 10^{-5} M, inibidor não seletivo de óxido nítrico sintase, observando-se declínio da produção de NO (Figura 22).

7.2.6 Thiamet G não modifica a redução da produção basal de NO em células endoteliais estimuladas por LPC

Além disso, foi necessário avaliar a participação da *O*-GlcNAc no efeito da LPC sobre a produção de NO por células endoteliais. Thiamet G não alterou a diminuição na produção basal de NO induzida pelo estímulo dessas células com LPC (Figura 22).

Figura 22 – Produção de NO basal avaliada por fluorimetria usando a sonda DAF-2 DA em células endoteliais estimuladas com LPC 10⁻⁵ M ou PBS (controle) por 24 h na presença de veículo ou Thiamet G. * p<0,05 controle respectivo vs. LPC, # p<0,05 controle positivo vs. controle negativo, \$ p<0,05 controle positivo vs. controle na ausência do Thiamet G (*two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey).

7.2.7 LPC gera estresse oxidativo em células endoteliais

Nas células endoteliais, o efeito de LPC na geração de EROs também foi avaliado. Nessas células, na ausência de outras drogas, LPC produziu estresse oxidativo. Além disso, o controle positivo desse experimento foi realizado com Ang II 10⁻⁷ M, observando-se nível acentuado de EROs. O controle negativo, por sua vez, foi feito com Ang II 10⁻⁷ M na presença do Tiron 10⁻⁴ M, um antioxidante e sequestrador de O₂^{•-} (Figura 23).

7.2.8 Thiamet G não altera o estresse oxidativo induzido por LPC em células endoteliais

Foi também necessário avaliar a participação da O-GlcNAc no efeito da LPC sobre o estresse oxidativo nas células endoteliais. Dessa forma, observou-se que mesmo na presença do Thiamet G, não houve diminuição da produção de EROs induzida por LPC (Figura 23).

Figura 23 – Geração de espécies reativas do oxigênio avaliada por fluorimetria usando DHE em células endoteliais estimuladas com LPC 10⁻⁵ M ou PBS (controle) por 24 h na presença de veículo ou Thiamet G. * p<0,05 controle respectivo vs. LPC, # p<0,05 controle positivo vs. controle negativo, \$ p<0,05 controle positivo vs. controle na ausência do Thiamet G (*two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey).

7.2.9 LPC diminui a fosforilação dos sítios de ativação em serina 1177 da eNOS em células endoteliais na presença de veículo ou Thiamet G

Para definir um mecanismo pelo qual a LPC diminui a produção basal de NO por células endoteliais, seus efeitos na expressão e atividade de eNOS foram avaliados. A incubação de células endoteliais com LPC reduziu a fosforilação dos resíduos de serina 1177 da eNOS na ausência do Thiamet G (Figuras 24A e 24B).

7.2.10 Thiamet G não modifica a diminuição induzida por LPC da fosforilação do sítio de ativação (serina 1177) da eNOS

Thiamet G, em células endoteliais, não modificou a redução da fosforilação do resíduo de serina 1177 da eNOS promovida pela incubação com LPC (Figuras 24A e 24B).

Figura 24 – Expressão de eNOS total e fosforilada no sítio de serina 1177 determinada por Western Blotting em células endoteliais estimuladas com LPC 10⁻⁵ M ou PBS [controle (C)] por 24 h na presença de veículo ou Thiamet G. (A) Imagem representativa da expressão proteica de eNOS total e fosforilada no sítio de serina 1177. Imagens adquiridas da mesma membrana após *stripping* seguida de marcação com o outro anticorpo. (B) Gráfico de barras relativo à expressão de eNOS fosforilada no sítio de serina 1177. (C) Gráfico de barras relativo à expressão de eNOS total. * p<0,05 controle respectivo vs. LPC (*two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey).

7.2.11 A LPC não altera a expressão de eNOS em células endoteliais na presença de veículo ou Thiamet G

LPC individualmente ou associação de LPC e Thiamet G não alterou a expressão de eNOS em células endoteliais (Figuras 24A e 24C).

7.2.12 A expressão de NOX4 em células endoteliais não se altera com estímulo promovido por LPC na presença de veículo ou Thiamet G

A incubação de células endoteliais com LPC não modificou a expressão de NOX4. O estímulo com Thiamet G separadamente ou concomitantemente com LPC também não promoveu mudanças nesse parâmetro (Figuras 25A e 25B).

Figura 25 – Expressão de NOX4 determinada por Western Blotting em células endoteliais estimuladas com LPC 10^{-5} M ou PBS [controle (C)] por 24 h na presença de veículo ou Thiamet G. (A) Imagem representativa da expressão proteica de NOX4. (B) Gráfico de barras relativo à expressão de NOX4.

Discussão

8. Discussão

Através de nossos estudos foi demonstrado que: 1) camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta hipercolesterolêmica da 15^a semana à 23^a semana de vida apresentam formação de placas ateroscleróticas no arco aórtico e intenso estresse oxidativo local; 2) nas regiões contendo lesões ateroscleróticas há maior nível de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc e aumento na expressão proteica das enzimas OGT e OGA; 3) camundongos ApoE^{-/-} apresentam, dentre as citocinas avaliadas, aumento na produção especialmente de TNF- α na gordura epididimal, o que é inibido por Thiamet G ou aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc; 4) animais ApoE^{-/-} exibem disfunção endotelial e Thiamet G não altera esse parâmetro; 5) camundongos ApoE^{-/-} exibem aumento na concentração sérica de nitrito e Thiamet G diminui esse nível; 6) LPC reduz a resposta vasodilatadora dependente de endotélio, induz estresse oxidativo e diminui a produção basal de NO em células endoteliais, eventos não alterados por Thiamet G; 7) isoladamente, LPC não altera o nível de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc em células endoteliais, mas intensifica o aumento induzido por Thiamet G e; 8) LPC diminui a fosforilação da eNOS no resíduo de serina 1177 em células endoteliais e Thiamet G não altera esse parâmetro. Esses resultados demonstram que a modificação por *O*-GlcNAc está associada a alguns, mas não a todos eventos notórios da aterogênese.

O modelo murino utilizado para estudar a aterosclerose foi o de camundongos com deficiência para apolipoproteína E através de deleção gênica. Apesar da formação das lesões ateroscleróticas ocorrerem mais rápido em camundongos que em humanos, os tipos celulares envolvidos e a presença de lipoproteínas oxidadas são comuns a ambas as espécies. Da mesma forma, as lesões tem predileção a pontos de ramificação e progridem das células espumosas a lesões fibroproliferativas (Jawien, 2012; Getz & Reardon, 2016). No presente estudo, a caracterização do modelo da doença nos animais ApoE^{-/-} foi possível pela visualização das placas no arco aórtico por análises histológicas e pela presença de estresse oxidativo intenso nesse mesmo ramo vascular.

No sistema cardiovascular existe dicotomia nos efeitos produzidos pela *O*-GlcNAc. As modificações por *O*-GlcNAc costumam ser benéficas no coração, mas maléficas na vasculatura. Outra dualidade está no fato que aumentos agudos de *O*-GlcNAc inibem estímulos estressores e tem efeito protetor, mas cronicamente afeta mais vias de sinalização moleculares e regula positivamente vias que são deletérias à função do sistema cardiovascular. O estresse oxidativo, por exemplo, quando gerado pela via das hexosaminas está associado a hiperglicemia (Lima *et al.*, 2012).

Esse contraste pode ser observado ao comparar os resultados de aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc nas placas ateroscleróticas com os dados obtidos em outros estudos demonstrando o benefício que o tratamento com drogas que aumentam a taxa de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc pode gerar agudamente. A expressão de quimiocinas, moléculas de adesão e o grau de infiltração por monócitos e certos tipos de granulócitos como os neutrófilos são importantes quesitos na avaliação do impacto de uma lesão aterosclerótica. Em um dos estudos, os animais foram tratados com glucosamina ou PUGNAc, droga que ao inibir a OGA aumenta a taxa de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. Nas artérias lesionadas de ratos submetidos à injúria endoluminal por cateter balão que, por não ser contínua, caracterizou-se como estímulo de caráter agudo, o tratamento dos animais com glucosamina ou PUGNAc foi benéfico, diminuindo o infiltrado de monócitos e de células granulocíticas como os neutrófilos. Além disso, a expressão de moléculas de adesão como a P-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 e das quimiocinas CINC-2 α , CINC-2 β e MCP-1 também foi reduzida com os tratamentos em geral (Xing *et al.*, 2008). Em estudos *in vitro* utilizando células de músculo liso, também se observou o mesmo comportamento. O aumento dos níveis de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc induzido agudamente por glucosamina reduziu a expressão induzida por TNF- α das quimiocinas CINC-2 β e MCP-1 e das moléculas de adesão VCAM-1 e P-selectina (Xing *et al.*, 2011). Em células endoteliais, a glucosamina também diminuiu a expressão induzida por TNF- α da quimiocina MCP-1 e da molécula de adesão ICAM-1 (Ju *et al.*, 2008). De acordo com essas evidências, podemos afirmar que em relação ao perfil inflamatório, pelo menos agudamente, a modificação de proteínas por *O*-GlcNAc nas células vasculares mostra-se benéfica. No entanto, segundo nossos resultados, esses benefícios seriam observáveis apenas nessas circunstâncias, mas não cronicamente, pois observamos um aumento no nível de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc nos segmentos arteriais contendo placas ateroscleróticas, podendo ser inclusive uma causa de alguns dos eventos associados à aterogênese, cuja característica é de um fenômeno que por sua vez tem caráter crônico. Dessa forma, através desse achado, a primeira impressão sugeriu que nessas condições crônicas, não esperaríamos um benefício decorrente de aumento do nível de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, mas talvez até mesmo o contrário. No entanto, em relação às citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α foi a única citocina cujo aumento foi estatisticamente significativo e Thiamet G reverteu essa produção, o que foi corroborado pelos estudos anteriormente citados. Esse fenômeno é sugestivo de que o aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc nas lesões ateroscleróticas pode então ser na verdade compensatório e não uma causa para os eventos deletérios. Sendo assim, o resultado obtido que mostra diminuição da concentração de TNF- α na gordura

epididimal pelo tratamento com Thiamet G é consistente com a literatura no que se refere a redução da expressão de citocinas por aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. Vale ressaltar que já foi demonstrado na literatura que depósitos lipídicos, como a gordura epididimal, em camundongos são homólogos ao tecido adiposo visceral de humanos (Choe *et al.*, 2016). Além disso, a inflamação do tecido adiposo visceral está associada à aceleração da aterosclerose, como observado pelo aumento na concentração plasmática de adipocinas e MCP-1 e pelo incremento no tamanho da lesão aterosclerótica nos camundongos que serviram como receptáculo no transplante de tecido adiposo visceral vindo de doadores com esses depósitos de gordura inflamados (Öhman *et al.*, 2008). O tecido adiposo visceral está associado ao perfil secretório de citocinas e adipocinas, além de modular o metabolismo de lipoproteínas. Sendo assim, esses depósitos lipídicos e suas adipocinas estão relacionadas a doenças cardiovasculares metabólicas como a aterosclerose coronariana (Fantuzzi & Mazzone, 2007).

Citocinas como a MCP-1, oncogene regulado por crescimento alfa (*growth-regulated oncogene alpha*, GRO- α) e fractalcina geralmente estão suprarreguladas na aterosclerose, mas a expressão varia em diferentes pontos específicos de tempo (Cheng *et al.*, 2007). Esses dados, além de corroborarem o aumento de TNF- α na gordura epididimal pelos animais ApoE^{-/-}, talvez expliquem a ausência de diferença na produção das outras citocinas avaliadas em nossos estudos, cuja expressão provavelmente flutua de acordo com o estágio da inflamação associada à aterosclerose.

Ao avaliar a expressão gênica de OGT e OGA, o RNAm de cada uma dessas enzimas estava aumentado no arco aórtico em comparação à aorta torácica de um mesmo animal. Essas alterações poderiam existir por se tratar de regiões em que o estresse de cisalhamento é diferente e não somente pela presença ou ausência de placa aterosclerótica, considerando a predileção de se formar lesões desse tipo no arco aórtico em detrimento à aorta torácica. Por isso, os experimentos que seguiram essa observação partiram do pressuposto de se avaliar o mesmo segmento arterial. Dessa forma, comparou-se então a expressão dessas enzimas somente no arco aórtico, mas tanto de animais com predisposição a aterosclerose quanto daqueles sem essa propensão e que consistiram nos camundongos ApoE^{-/-} e WT, respectivamente. Observou-se então que a superexpressão dessas enzimas era de fato aumentada devido a presença das placas ateroscleróticas, considerando que nesse desenho experimental avaliou-se o mesmo ramo vascular e que, portanto, apresentava estresse de cisalhamento semelhante. No entanto, já foi demonstrado que alterações nos padrões de estresse de cisalhamento modulam a expressão gênica de alguns marcadores importantes na aterosclerose, como ocorre com os genes de mediadores inflamatórios pró-aterogênicos, incluindo por exemplo, a IL-6, CRP, VCAM-1 e

ICAM-1. Essa variação influencia o tamanho da placa e o fenótipo de vulnerabilidade (Cheng *et al.*, 2006). Dessa forma, os genes das enzimas OGT e OGA podem ser igualmente regulados por variações na tensão de cisalhamento. Além disso, essas modificações não são promovidas apenas na expressão dos genes. Foi demonstrado que a enzima eNOS, importante no metabolismo do endotélio e na proteção anti-aterogênica, entre regiões com estresse de cisalhamento distinto, apresenta diferente distribuição intracelular e mudanças no perfil de atividade avaliado pela fosforilação no resíduo de serina 1177, correspondente ao sítio de ativação (Cheng *et al.*, 2005).

Nos experimentos realizados, o aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc foi acompanhado não só pelo aumento da expressão de OGT como esperado, mas também por aumento da OGA, evento que a princípio é contraditório. No entanto, dados da literatura mostram que a homeostase dessa modificação pós-traducional é sensível às flutuações moleculares do ambiente, inclusive retornando a condições basais após remoção do estímulo. Considerando isso, nesse mesmo estudo também foram observados singelos aumentos da expressão de OGA mesmo em condições que a expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc estava aumentada em modelo de superexpressão da OGT em neuroblastos (Zhang *et al.*, 2014). Outro fator relevante e que não foi avaliado podendo ter contribuído para essas observações no presente estudo é a atividade da enzima OGA. Nesse caso, por mais que a expressão esteja aumentada, a atividade dessa enzima ainda pode estar baixa.

A hipercolesterolemia prejudica a função vasomotora ao comprometer a vasodilatação dependente de endotélio a metacolina como observado em animais ApoE^{-/-} e WT submetidos a dieta Western, em comparação aos seus respectivos controles com dieta padrão (Raman *et al.*, 2011), o que corrobora a observação feita em nossos estudos de prejuízo no relaxamento dependente de endotélio em camundongos ApoE^{-/-}. O aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc melhora a função vascular em resposta a estímulos inflamatórios, conforme observado em um trabalho anterior em que vasos de ratos foram incubados com TNF- α . Nesse caso, o aumento de *O*-GlcNAc mostrou-se positivo para a função vascular frente a estímulos inflamatórios deletérios, um dos componentes chave na aterosclerose e, por isso, tal efeito seria de se esperar nos vasos dos animais ApoE^{-/-} (Hilgers *et al.*, 2012). No entanto, essa observação não se reproduziu em nosso trabalho. Já foi demonstrado que a ativação da via das hexosaminas e o consequente aumento no nível de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc prejudica a dilatação arteriolar mediada por NO, ou seja, dependente de endotélio. Sabe-se que a fosforilação e a modificação por *O*-GlcNAc ocorrem nos mesmos sítios e, portanto, competem entre si. Dessa forma, o mecanismo envolvido proposto e demonstrado pelo estudo anterior foi a diminuição

da fosforilação do resíduo de serina 1177, o sítio de ativação da eNOS, devido ao aumento na modificação por *O*-GlcNAc (Beleznai & Bagi, 2012). Considerando esse fato, nossos dados mostram que a presença de LPC, um dos lipídeos derivados de lipoproteínas aterogênicas, intensifica o aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc induzido por Thiamet G em células endoteliais. Dessa forma, sugere-se que o benefício anti-inflamatório da *O*-GlcNAc na dilatação dependente de endotélio seria abolido pelo excesso de modificação por *O*-GlcNAc no resíduo de serina 1177 da eNOS, ou seja, presume-se que a diminuição da fosforilação e consequente redução da atividade da eNOS pesaria negativamente no relaxamento dependente de NO. Esse evento contrabalancearia assim o resultado positivo observado na função endotelial que é obtido pelo efeito anti-inflamatório decorrente do aumento de *O*-GlcNAc. Nesse sentido, dois pontos precisam ser considerados. O primeiro deles é que lipídeos aterogênicos como a LPC intensificam a modificação por *O*-GlcNAc quando o Thiamet G está envolvido e o resultado disso é a diminuição da fosforilação no sítio de ativação da eNOS. O segundo ponto é que os animais ApoE^{-/-} ficaram expostos a esses lipídeos aterogênicos e, por isso, não tiveram melhora na resposta vascular de relaxamento à ACh após tratamento com Thiamet G. O mesmo vale, ainda mais, para o prejuízo na resposta vasodilatadora dependente de endotélio das artérias diretamente incubadas com LPC na presença do Thiamet G.

A exposição à oxLDL reduz tanto o tônus contrátil quanto respostas de vasodilatação em artérias carótidas (Napoli *et al.*, 1997). Em relação à LPC individualmente, um trabalho anterior já demonstrou que ela diminui o relaxamento dependente de endotélio. A causa disso é a diminuição da biodisponibilidade de NO provocada por desacoplamento da eNOS e estresse oxidativo (Kozina *et al.*, 2014.) Esse estudo anterior corroborou o prejuízo na dilatação dependente de endotélio dos vasos incubados com LPC. No entanto, em relação ao estímulo com a LPC, o uso de droga que aumenta os níveis de *O*-GlcNAc, como o Thiamet G, tendeu a piorar a disfunção endotelial, apesar de que o tratamento *in vivo* com essa droga não alterou a resposta vasodilatadora à ACh em animais ApoE^{-/-}. Uma possível explicação na tendência do Thiamet G em piorar esse parâmetro foi fornecida anteriormente e é a mesma que justifica a ausência de alteração na reatividade vascular após tratamento *in vivo* com a mesma droga. Esses resultados mostram que o aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc induzido por Thiamet G, por um lado, melhora o perfil inflamatório, mas, por outro, não previne a disfunção endotelial. Essa ausência de efeito protetor foi observada tanto no tratamento com essa droga *in vivo* quanto *in vitro*.

O NO endotelial é benéfico para a vasculatura por promover relaxamento arteriolar, inibir a proliferação e migração de células de músculo liso, inibir a aderência de plaquetas e

limitar a quimiotaxia de leucócitos. Camundongos deficientes para eNOS apresentam aterosclerose acelerada, enquanto que a deleção gênica da iNOS, enzima induzida por citocinas pró-inflamatórias em contextos inflamatórios, leva a redução na formação de placas (Barbato & Tzeng, 2004). A indução de iNOS em aterosclerose coronariana inclusive está relacionada a fatores de instabilidade das placas (Depre *et al.*, 1999). Em contraste a condições saudáveis, a hiperlipidemia e a aterosclerose são condições em que o NO é produzido em excesso pela iNOS nos vasos sanguíneos. As citocinas induzem a iNOS nos macrófagos que então deprimem o estoque de L-arginina interferindo na atividade da eNOS e podendo gerar $O_2^{\cdot-}$ e $ONOO^-$ em excesso (Jorens *et al.*, 1995; Dusting *et al.*, 1998). A expressão de iNOS no endotélio favorece a adesão leucocitária e plaquetária e, em constraste à eNOS, essa isoforma produz grandes quantidades de NO e em períodos sustentados (Matthys & Bult, 1997; Dusting *et al.*, 1998). O NO junto a seus produtos oxidantes primários, como o $O_2^{\cdot-}$, ou secundários, como o $ONOO^-$, não oxidam apenas lipoproteínas, mas também a membrana celular fosfolipídica (Rubbo *et al.*, 2000). Em suma, a iNOS, uma vez induzida por reações e estímulos inflamatórios, gera NO e EROs derivadas que levam a citotoxicidade e dano celular, estando envolvida em doenças vasculares (Dusting *et al.*, 1998). O NO é metabolizado em nitrato e nitrito (Jorens *et al.*, 1995) e este último foi quantificado para mensurar a produção de NO. Em condições aterogênicas e considerando a inflamação associada, é de se esperar na verdade uma redução do NO oriundo da isoforma endotelial em detrimento ao aumento de sua síntese pela iNOS. Os níveis séricos de nitrito estavam bem elevados em nossas análises, o que nos leva a crer que é derivado de NO sintetizado pela iNOS e não pela eNOS. Esse é um resultado consistente ao considerar esse balanço entre o NO protetor da eNOS que é produzido basalmente e está relacionado a vasorelaxamento e citoproteção e o NO deletério vindo da iNOS em condições inflamatórias, como na aterosclerose, sendo que este é sintetizado em altas taxas e está associado a hiperreatividade e adesão plaquetária (Depre *et al.*, 1999). O Thiamet G reduziu os níveis de nitrito, sendo uma observação de mais um benefício anti-inflamatório do aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc, além da redução do TNF- α descrita anteriormente.

A LPC é um dos principais lipídeos presentes na oxLDL e é responsável por determinados eventos presentes na aterogênese, como a disfunção endotelial e aumento de EROs (Kozina *et al.*, 2014; Campos-Mota *et al.*, 2017). Como demonstrado por outro trabalho, o estresse oxidativo é um dos parâmetros tanto que se altera quanto contribui para a fisiopatologia da disfunção endotelial e da aterosclerose, reforçando-as (Föstermann *et al.*, 2017). A produção de NO também foi comprometida pela LPC como mostrado em um trabalho que relaciona esse fenômeno deletério de redução da biodisponibilidade de NO com o aumento

de EROs (Kozina *et al.*, 2014). Esses resultados corroboram o aumento de EROs e a diminuição de NO basal dos nossos estudos *in vitro* com células endoteliais e LPC.

Em células endoteliais, a LPC intensificou a modificação por *O*-GlcNAc induzida por Thiamet G, fenômeno que é consistente com o aumento da participação dessa modificação pós-traducional de proteínas no modelo animal, conforme observado nas análises moleculares dos arcos aórticos contendo placas ateroscleróticas. Tal resultado sugere que os lipídeos presentes nas placas participam da superativação da *O*-GlcNAc. Não é possível definir ainda se para os demais eventos aterogênicos com excessão da inflamação, essa superativação contribui para as características deletérias das placas ou representa mecanismo compensatório, na tentativa de reverter esse fenômeno.

Conclusão

9. Conclusão

Os resultados demonstram que a modificação por *O*-GlcNAc e as enzimas que a regulam estão aumentadas em placas ateroscleróticas. Nossos dados sugerem ainda que o aumento de *O*-GlcNAc gera efeito anti-inflamatório na aterosclerose, como demonstrado pela redução na produção de TNF- α e nas dosagens séricas de nitrito, mas é necessário mais estudos para confirmar melhor como essa relação entre aterosclerose e *O*-GlcNAc se processa, no sentido de ser deletéria ou compensatória, entendendo os mecanismos moleculares que envolvem o aumento dessa modificação pós-traducional de proteínas na aterosclerose e avaliar a participação dela em relação a outros eventos, como infiltração de macrófagos, conteúdo lipídico e de células de músculo liso, estresse oxidativo, entre outros.

Referências bibliográficas

10. Referências bibliográficas

Akella, NM., Ciraku, L., Reginato, MJ. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biol.* 2019; 17:52.

Akmal, MA., Rasool, N., Khan, YD. Prediction of N-linked glycosylation sites using position relative features and statistical moments. *PLoS One.* 2017; 12(8):e0181966.

Albrecht, U. *et al.* Activation of NF- κ B by IL-1 β blocks IL-6-induced sustained STAT3 activation and STAT3-dependent gene expression of the human γ -fibrinogen gene. *Cell Signal.* 2007; 19(9):1866-1878.

Alfaid, M. *et al.* Neutrophil elastase promotes interleukin-1 β secretion from human coronary endothelium. *J Biol Chem.* 2015; 290(40): 24067-24078.

Angus, JA., Wright, CE. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000; 44:395-407.

Apostolakis, S. *et al.* Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2009; 84(3):353-360.

Arndt, H., Bolanowski, MA., Granger, DN. Role of interleukin 8 on leucocyte-endothelial cell adhesion in intestinal inflammation. *Gut.* 1996; 38:911-915.

Apostol, I. *et al.* Recombinant protein sequences can trigger methylation of N-terminal amino acids in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 1995; 4:2616-2618.

Apostolopoulos, J., Davenport, P., Tipping, PG. Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16(8):1007-1012.

Audagnotto, M., Dal Peraro, M. Protein post-translational modifications: *In silico* prediction tools and molecular modeling. *Comput Struct Biotechnol J.* 2017; 15:307-319.

Bäck, M., Weber, C., Lutgens, E. Regulation of atherosclerotic plaque inflammation. *J Intern Med.* 2015; 278:462-482.

Badimon, L., Padró, T., Vilahur, G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2012; 1(1):60-74.

Barbato, JE., Tzeng, E. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg.* 2004; 40:187-193.

Beckman, JA., Creager, MA., Libby, P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA.* 2002; 287:2570-2581.

Beleznai, T., Bagi, Z. Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein *O*-GlcNAcylation. *Vascul Pharmacol.* 2012; 56(3-4):115-121.

Bennett, MR., Sinha, S., Owens, GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res.* 2016; 118(4):692-702.

Bentzon, JF. *et al.* Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ Res.* 2014; 114:1852-1866.

Bie, J. *et al.* Liver-Specific Cholesteryl Ester Hydrolase Deficiency Attenuates Sterol Elimination in the Feces and Increases Atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33:1795-1802.

Bogiatzi, C., Spence D. Ezetimibe and regression of carotid atherosclerosis: importance of measuring plaque burden. *Stroke.* 2012; 43:1153-1155.

Bojarová, P., Williams, SJ. Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination. *Curr Opin Chem Biol.* 2008; 12:573-581.

Bonthu, S. *et al.* Atherosclerosis, Vascular Remodeling, and Impairment of Endothelium-Dependent Relaxation in Genetically Altered Hyperlipidemic Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(11):2333-2340.

- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.
- Branén, L. *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(11):2137-2142.
- Cabib, E., Leloir, LF., Cardini, CE. Uridine diphosphate acetylglucosamine. *J Biol Chem.* 1953; 203(2):1055-1070.
- Callegari, A. *et al.* Gain and Loss of Function for Glutathione Synthesis: Impact on Advanced Atherosclerosis in Apo E Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(11):2473-2482.
- Campos-Mota, GP. *et al.* Role of ERK1/2 activation and nNOS uncoupling on endothelial dysfunction induced by lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis.* 2017; 258:108-118.
- Caro, CG., Fitz-Gerald, JM., Schroter RC. Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature.* 1969; 223:1159-1161.
- Castellon, X., Bogdanova, V. Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction. *Aging Dis.* 2016; 7(1):81-89.
- César, TB. *et al.* High Cholesterol Intake Modifies Chylomicron Metabolism in Normolipidemic Young Men. *J Nutr.* 2006; 136(4):971-976.
- Chang, MC. *et al.* Lysophosphatidylcholine induces cytotoxicity/apoptosis and IL-8 production of human endothelial cells: Related mechanisms. *Oncotarget.* 2017; 8(63):106177-106189.
- Chapman-Smith, A., Cronan, JE Jr. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24:359-363.
- Chauhan, JS., Rao, A., Raghava, GPS. *In silico* Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences. *PLoS One.* 2013; 8(6):e67008.

Chen, JK., Shen, CR., Liu, CL. N-Acetylglucosamine: Production and Applications. *Mar Drugs*. 2010; 8:2493-2516.

Cheng, PW., Carlson, DM. Mechanism of phosphoacetylglucosamine mutase. *J Biol Chem*. 1979; 254(17):8353-8357.

Cheng, X., Hart, GW. Alternative O-Glycosylation/O-Phosphorylation of Serine-16 in Murine Estrogen Receptor β : Post-Translational Regulation of Turnover and Transactivation Activity. *J Biol Chem*. 2001; 276(13):10570-10575.

Cheng, C. *et al*. Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique. *Blood*. 2005; 106(12):3691-3698.

Cheng, C. *et al*. Atherosclerotic Lesion Size and Vulnerability Are Determined by Patterns of Fluid Shear Stress. *Circulation*. 2006; 113(23):2744-2753.

Cheng, C. *et al*. Shear stress-induced changes in atherosclerotic plaque composition are modulated by chemokines. *J Clin Invest*. 2007; 117(3):616-626.

Chiang, JYL. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol*. 2004; 40:539-551.

Chiang, JYL. Bile Acid Metabolism and Signaling. *Compr Physiol*. 2013; 3(3):1191-1212.

Chiaradonna, F., Ricciardiello, F., Palorini, R. The Nutrient-Sensing Hexosamine Biosynthetic Pathway as the Hub of Cancer Metabolic Rewiring. *Cells*. 2018; 7:53.

Chistiakov, DA. *et al*. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med*. 2017; 95(11):1153-1165.

Choe, SS. *et al*. Adipose Tissue Remodeling: its Role in energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016; 7:30.

- Choi, YB. *et al.* Increased lysine N-methylation of a 23-kDa protein during hepatic regeneration. *Exp Mol Med.* 2005; 37(3):155-160.
- Cipollone, F., Fazia, ML. COX-2 and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47(suppl 1):S26-S36.
- Cogswell, JP. *et al.* NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J Immunol.* 1994; 153(2):712-723.
- Collins, T. *et al.* Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 1995; 9:899-909.
- Collins, T., Cybulsky, MI. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?. *J Clin Invest.* 2001; 107(3):255-264.
- Cooper, AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res.* 1997; 38:2173-2192.
- Coussen, F. *et al.* Addition of a Glycophosphatidylinositol to Acetylcholinesterase: Processing, degradation, and secretion. *J Biol Chem.* 2001; 276(30):27881-27892.
- Da Costa, RM. *et al.* Increased O-GlcNAcylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Compromises the Anti-contractile Properties of Perivascular Adipose Tissue in Metabolic Syndrome. *Front Physiol.* 2018; 9:341.
- Dai, Y., Ge, J. Clinical Use of Aspirin in Treatment and Prevention of Cardiovascular Disease. *Thrombosis.* 2012; 2012:245037.
- Dalle-Donne, I. *et al.* S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43:883-898.
- Dall'Olio, GM. *et al.* The annotation of the asparagine N-linked glycosylation pathway in the *Reactome* database. *Glycobiology.* 2011; 21(11):1395-1400.

Darley-Usmar, VM., Ball, LE., Chatham, JC. Protein O-linked β -N-acetylglucosamine: A novel effector of cardiomyocyte metabolism and function. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52(3):538-549.

Das, UN. Atherosclerosis and prostaglandins. *Int J Tissue React.* 1982; 4(2):127-132.

Davenport, P., Tipping, PG. The Role of Interleukin-4 and Interleukin-12 in the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Am J Pathol.* 2003; 163(3):1117-1125.

Davidson, EA., Blumenthal, HJ., Roseman, S. Glucosamine metabolism. II. Studies on glucosamine 6-phosphate N-acetylase. *J Biol Chem.* 1957; 226(1):125-133.

Davies, SW. Clinical presentation and diagnosis of coronary artery disease: stable angina. *Br Med Bull.* 2001; 59:17-27.

Davies, PF. *et al.* The convergence of haemodynamics, genomics, and endothelial structure in studies of the focal origin of atherosclerosis. *Biorheology.* 2002; 39(3-4):299-306.

Davignon, J., Ganz, P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation.* 2004; 109(23 Suppl 1):III27-32.

DePalma, RG. *et al.* Atherosclerotic plaque regression in rhesus monkeys induced by bile acid sequestrant. *Exp Mol Pathol.* 1979; 31(3):423-439.

Depre, C. *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res.* 1999; 41:465-472.

Deshmane, SL. *et al.* Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009; 29(6): 313-326.

DiVietro, JA. *et al.* Immobilized IL-8 Triggers Progressive Activation of Neutrophils Rolling In Vitro on P-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1. *J Immunol.* 2001; 167(7):4017-4025

Doran, AC., Meller, N., McNamara, CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(5):812-819.

Drost, EM., MacNee, M. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF- α in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur J Immunol.* 2002; 32(2):393-403.

Du, XL. *et al.* Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest.* 2001; 108:1341-1348.

Duan, G., Walther, D. The Roles of Post-translational Modifications in the Context of Protein Interaction Networks. *PLoS Comput Biol.* 2015; 11(2):e1004049.

Dudognon, P. *et al.* Regulation of a COPII component by cytosolic O-glycosylation during mitosis. *FEBS Lett.* 2004; 561(1-3):44-50.

Dusting, GJ. *et al.* Nitric oxide in atherosclerosis: vascular protector or villain?. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998; 25(Suppl.):S34-S41.

Dzau, VJ., Braun-Dullaeus, RC., Sedding, DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2002; 8(11):1249-1256.

Einarsson, K. *et al.* Bile acid sequestrants: mechanisms of action on bile acid and cholesterol metabolism. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991; 40(suppl 1):S53-S58.

El Hadri, K. *et al.* Thioredoxin-1 promotes anti-inflammatory macrophages of the M2 phenotype and antagonizes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(6):1445-1452.

Fantuzzi, G., Mazzone, T. Adipose Tissue and Atherosclerosis: Exploring the Connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:996-1003.

Fatkhullina, AR., Peshkova, IO., Koltsova, EK. The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. *Biochemistry (Mosc).* 2016; 81(11):1358-1370.

Faulkner, K., Fridovich, I. Luminol and lucigenin as detectors for O₂⁻. Free Radic Biol Med. 1993; 15(4):447-451.

Fazio, S., Linton, MRF. The Role of Fibrates in Managing Hyperlipidemia: Mechanisms of Action and Clinical Efficacy. Curr Atheroscler Rep. 2004; 6(2):148-157.

Feingold, KR., Grunfeld, C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. (Atualizado em 02 de fevereiro de 2018). In: _____. *et al.*, editores. Endotext [Internet]. South Dartmouth, MA, EUA: MDTText.com, Inc., 2000-.

Fernandez-Sorensen, A., Carlson, DM. Purification and properties of phosphoacetylglucosamine mutase. J Biol Chem. 1971; 246(11):3485-3493.

Fong, JJ. *et al.* β -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Is a Novel Regulator of Mitosis-specific Phosphorylations on Histone H3. J Biol Chem. 2012. 287(15):12195-12203.

Förstermann, U. *et al.* Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. Circ Res. 1988; 62(2):185-190.

Förstermann, U., Xia, N., Li, H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Circ Res. 2017; 120:713-735.

Friedewald, WT., Levy, RI., Fredrickson, DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. Clin Chem. 1972; 18(6):499-502.

Frostegard, J. *et al.* Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. Atherosclerosis. 1999; 145:33-43.

Galis, ZS., Khatri, JJ. Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis: The Good, the Bad, and the Ugly. Circ Res. 2002; 90(3):251-262.

Galle, J. *et al.* Endothelial dysfunction and inflammation: What is the link?. *Kidney Int Suppl.* 2003a; 63(suppl 84):S45-S49.

Galle, J. *et al.* Oxidized LDL and its Compound Lysophosphatidylcholine Potentiate AngII-Induced Vasoconstriction by Stimulation of RhoA. *J Am Soc Nephrol.* 2003b; 14:1471-1479.

Galle, J. *et al.* Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis.* 2006; 185:219-226.

Getz, GS., Reardon, CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res.* 2009; Suppl:S156-S161.

Getz, GS., Reardon, CA. ApoE knockout and knockin mice: the history of their contribution to the understanding of atherogenesis. *J Lipid Res.* 2016; 57:758-766.

Getz, GS., Reardon, CA. Apoprotein E and Reverse Cholesterol Transport. *Int J Mol Sci.* 2018; 19:3479.

Ghosh, S. *et al.* Glucosamine metabolism. V. Enzymatic synthesis of glucosamine 6-phosphate. *J Biol Chem.* 1960; 235(5):1265-1273.

Givens, C., Tzima, E. Endothelial Mechanosignaling: Does One Sensor Fit All?. *Antioxid Redox Signal.* 2016; 25(7):373-388.

Goldberg, IJ., Eckel, RH., Abumrad, NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res.* 2009; 50(Suppl):S86-S90.

Goldstein, JL., Brown, MS. The Low-Density Lipoprotein Pathway and its Relation to Atherosclerosis. *Ann Rev Biochem.* 1977; 46:897-930.

Gotto, AM Jr. Some reflections on arteriosclerosis: past, present, and future. *Circulation.* 1985; 72(1):8-17.

Greenlee, L., Fridovich, I., Handler, P. Chemiluminescence induced by operation of iron-flavoproteins. *Biochemistry*. 1962; 1(5):779-783.

Grillari, J., Grillari-Voglauer, R., Jansen-Dürr, P. Post-Translational Modification of Cellular Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Molecules: Role in Cellular Senescence and Ageing. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 694:172-196.

Gu, L. *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998; 2(2): 275-281.

Guo, X. *et al.* Alterations in left ventricular function during intermittent hypoxia: Possible involvement of O-GlcNAc protein and MAPK signaling. *Int J Mol Med*. 2015; 36:150-158.

Guo, Q. *et al.* Structural insights into SETD3-mediated histidine methylation on β -actin. *Elife*. 2019; 8(pii):e43676.

Guzik, TJ. *et al.* Calcium dependent Nox5 NADPH oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52(22):1803-1809.

Gylling, H. *et al.* Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2014; 232(2):346-360.

Han, I., Kudlow, JE. Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol*. 1997; 17(5):2550-2558.

Handy, DE., Castro, R., Loscalzo, J. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2011; 123(19):2145-2156.

Hanover, JA., Krause, MW., Love, DC. The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800:80-95.

Hansson, G. K., Libby, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:508-519.

Harman, NL., Leeds, AR., Griffin, BA. Increased dietary cholesterol does not increase plasma low density lipoprotein when accompanied by an energy-restricted diet and weight loss. *Eur J Nutr.* 2008; 47:287-293.

Hasanov, Z. *et al.* Endosialin Promotes Atherosclerosis Through Phenotypic Remodeling of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37(3):495-505.

Havel, RJ. The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res.* 1984; 25:1570-1576.

Haynes, PA. Phosphoglycosylation: A new structural class of glycosylation?. *Glycobiology.* 1998; 8(1):1-5.

Herrington, W. *et al.* Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res.* 2016; 118(4):535-546.

Hilgers, RHP. *et al.* Acute O-GlcNAcylation prevents inflammation-induced vascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; 303(5):H513-H522.

Houten, SM., Wanders, RJA. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33:469-477.

Hu, J. *et al.* Augmented O-GlcNAc signaling via glucosamine attenuates oxidative stress and apoptosis following contrast-induced acute kidney injury in rats. 2017; 103:121-132.

Huff, MW. Dietary cholesterol, cholesterol absorption, postprandial lipemia and atherosclerosis. *Can J Clin Pharmacol.* 2003; 10 Suppl A:26A-32A.

Hull, G. Caleb Hillier Parry 1755-1822: a notable provincial physician. *J R Soc Med.* 1998; 91:335-338.

Hwang, J., Lee, JA., Pallas, DC. Leucine Carboxyl Methyltransferase 1 (LCMT-1) Methylates Protein Phosphatase 4 (PP4) and Protein Phosphatase 6 (PP6) and Differentially Regulates the Stable Formation of Different PP4 Holoenzymes. *J Biol Chem.* 2016; 291(40):21008-21019.

Ilhan, F., Kalkanli, ST. Atherosclerosis and the role of immune cells. *World J Clin Cases*. 2015; 3(4):345-352.

Inaba, T. *et al*. Cholesterol Reduction and Atherosclerosis Inhibition by Bezafibrate in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. *Hypertens Res*. 2008; 31(5):999-1005.

Ingaramo, M., Beckett, D. Biotinylation, a Post-translational Modification Controlled by the Rate of Protein-Protein Association. *J Biol Chem*. 2011; 286(15):13071-13078.

Itkonen, HM. *et al*. O-GlcNAc Transferase Integrates Metabolic Pathways to Regulate the Stability of c-MYC in Human Prostate Cancer Cells. *Canc Res*. 2013; 73(16):5277-5287.

Ittaman, SV., VanWormer, JJ., Rezkalla, SH. The Role of Aspirin in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Clin Med Res*. 2014; 12(3-4):147-154.

Jaipersad, AS. *et al*. The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63(1):1-11.

James, LR. *et al*. Flux Through the Hexosamine Pathway Is a Determinant of Nuclear Factor κ B- Dependent Promoter Activation. *Diabetes*. 2002; 51(4):1146-1156.

Janetzko, J., Walker, S. The Making of a Sweet Modification: Structure and Function of O-GlcNAc Transferase. *J Biol Chem*. 2014; 289:34424-34432.

Jawien, J. The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13(13):2435-2439.

Jorens, PG., Matthys, KE., Bult, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators Inflamm*. 1995; 4:75-89.

Ju, Y. *et al*. Modulation of TNF-alpha-induced endothelial cell activation by glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide. *Int J Mol Med*. 2008; 22:809-815.

Kabil, O., Banerjee, R. Redox Biochemistry of Hydrogen Sulfide. *J Biol Chem.* 2010; 285(29):21903-21907.

Kamanna, VS., Kashyap, ML. Mechanism of Action of Niacin. *Am J Cardiol.* 2008; 101(8A):20B-26B.

Kapourchali, FR. *et al.* The Role of Dietary Cholesterol in Lipoprotein Metabolism and Related Metabolic Abnormalities: A Mini-review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016; 56(14):2408-2415.

Karavia, EA. *et al.* Apolipoprotein A-I Modulates Processes Associated with Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Mol Med.* 2012;18:901-912.

Kasikara, C. *et al.* The role of non-resolving inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2018; 128(7):2713-2723.

Kempe, S. *et al.* NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(16):5308-5319.

Keshet, Y., Seger, R. The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. *Methods Mol Biol.* 2010; 661:3-38.

Khan, IA., Mehta, NJ. Initial historical descriptions of the angina pectoris. *J Emerg Med.* 2002; 22(3):295-298.

Kim, HY. *et al.* Upregulation of Interleukin-8/CXCL8 in Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertens Res.* 2008; 31:515-523.

Kirii, H. *et al.* Lack of Interleukin-1 β Decreases the Severity of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:656-660.

Kleemann, R., Zadelaar, S., Kooistra, T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 2008; 79:360-376.

Klotz, AV., Leary, JA., Glazer, AN. Post-translational methylation of asparaginy residues: Identification of beta-71 gamma-N-methylasparagine in allophycocyanin. *J Biol Chem.* 1986; 261(34):15891-15894.

Klumpp, S., Krieglstein, J. Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem.* 2002; 269:1067-1071.

Koenen, RR., Weber, C. Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis. *EMBO Mol Med.* 2011; 3(12):713-725.

Kozina, A. *et al.* Oleoyl-Lysophosphatidylcholine Limits Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Induction of Reactive Oxygen Species. *PLoS One.* 2014; 9(11):e113443.

Kwan, BCH. *et al.* Lipoprotein Metabolism and Lipid Management in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:1246-1261.

Laczy, B. *et al.* Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296:H13-H28.

Ladeiras-Lopes, R. *et al.* Atherosclerosis: Recent trials, new targets and future directions. *Int J Cardiol.* 2015; 192:72-81.

Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?. *Circulation.* 2004; 109(suppl II):II27-II33.

Larner, AJ. Caleb Hillier Parry (1755-1822): clinician, scientist, friend of Edward Jenner (1749-1823). *J Med Biogr.* 2005; 13:189-194.

Lecerf, JM., Lorgeil, M. Dietary cholesterol: from physiology to cardiovascular risk. *Br J Nutr.* 2011; 106:6-14.

Lee, TS. *et al.* The Role of Interleukin 12 in the Development of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:734-742.

Lee, CH., Olson, P., Evans, RM. Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology*. 2003; 144(6):2201-2207.

Lee, M. *et al.* Efficacy of fibrates for cardiovascular risk reduction in persons with atherogenic dyslipidemia: A meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2011; 217:492-498.

Lee, S. Post-Translational Modification of Proteins in Toxicological Research: Focus on Lysine Acylation. *Toxicol Res*. 2013; 29(2):81-86.

Lee, JJ., Lee, DH. Leucine methylation of protein phosphatase PP4C at C-terminal is critical for its cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 452:42-47.

Lefebvre, T. *et al.* Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800:67-79.

Lehr, HA. *et al.* In vitro effects of oxidized low density lipoprotein on CD11b/CD18 and L-selectin presentation on neutrophils and monocytes with relevance for the in vivo situation. *Am J Pathol*. 1995; 146(1): 218-227.

Lesnik, P., Haskell, CA., Charo, IF. Decreased atherosclerosis in *CX₃CR1^{-/-}* mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003; 111(3):333-340.

Levental, I., Grzybek, M., Simons, K. Greasing Their Way: Lipid Modifications Determine Protein Association with Membrane Rafts. *Biochemistry*. 2010; 49:6305-6316.

Li, Y. *et al.* O-GlcNAcylation modulates Bmi-1 protein stability and potential oncogenic function in prostate cancer. *Oncogene*. 2017; 36:6293-6305.

Libby, P., Ridker, PM., Maseri, A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002a; 105:1135-1143.

Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002b; 420:868-874.

Libby, P., Aikawa, M. Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. *Nature Med.* 2002c; 8(11): 1257-1262.

Libby, P., Pasterkamp, G. Requiem for the ‘vulnerable plaque’. *Eur Heart J.* 2015; 36:2984-2987.

Libermann, TA., Baltimore, D. Activation of Interleukin-6 Gene Expression through the NF- κ B Transcription Factor. *Mol Cell Biol.* 1990; 10(5):2327-2334.

Lima, VV. *et al.* Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli – VASOACTIVE PEPTIDE SYMPOSIUM. *J Am Soc Hypertens.* 2008; 2(6):410-417.

Lima, VV. *et al.* Impaired vasodilator activity in DOCA-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. *Hypertension.* 2009; 53(2):166-174.

Lima, VV. *et al.* O-GlcNAcylation Contributes to Augmented Vascular Reactivity Induced by Endothelin 1. *Hypertension.* 2010; 55(1):180-188.

Lima, VV. *et al.* O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 300:R236-R250.

Lima, VV. *et al.* O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter?. *Clin Sci (Lond).* 2012; 123:473-486.

Linden, F. *et al.* Inflammatory therapeutic targets in coronary atherosclerosis—from molecular biology to clinical application. *Front Physiol.* 2014; 5:455.

Linton, MRF., Fazio, S. Cyclooxygenase products and atherosclerosis. *Drug Discov Today Ther Strateg.* 2008; 5(1):25-36.

Liu, K. *et al.* Accumulation of protein O-GlcNAc modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high O-GlcNAc metabolism. *J Neurochem.* 2004. 1044-1055.

Liu, W. *et al.* OxLDL-induced IL-1 beta secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production leading to NLRP3 inflammasome activation. *Inflamm Res.* 2014; 63:33-43.

Liu, Y. *et al.* O-GlcNAc elevation through activation of the hexosamine biosynthetic pathway enhances cancer cell chemoresistance. *Cell Death Dis.* 2018; 9(5):485.

Lopez-Castejon, G., Brough, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22(4):189-195.

Lyngdoh, T. *et al.* Association of statins with inflammatory cytokines: A population-based ColaUS study. *Atherosclerosis.* 2011; 219:253-258.

Lyon, CA., Wadey, KS., George, SJ. Soluble N-cadherin: A novel inhibitor of VSMC proliferation and intimal thickening. *Vascul Pharmacol.* 2016; 78:53-62.

Ma, Z., Vocadlo, DJ., Vosseller, K. Hyper-O-GlcNAcylation Is Anti-apoptotic and Maintains Constitutive NF- κ B Activity in Pancreatic Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2013; 288(21):15121-15130.

Mahley, RW. *et al.* Chylomicron remnant metabolism. Role of hepatic lipoprotein receptors in mediating uptake. *Arteriosclerosis.* 1989; 9(1 Suppl):I14-I18.

Majumdar, G. *et al.* Insulin Dynamically Regulates Calmodulin Gene Expression by Sequential O-Glycosylation and Phosphorylation of Sp1 and Its Subcellular Compartmentalization in Liver Cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(6):3642-3650.

Mallat, Z. *et al.* Protective Role of Interleukin-10 in Atherosclerosis. *Circ Res.* 1999; 85:e17-e24.

Marozkina, MV., Gaston, B. S-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1820(6):722-729.

- März, W., Wieland, H. HMG-CoA Reductase Inhibition: Anti-Inflammatory Effects beyond Lipid Lowering?. *Herz*. 2000; 25(2):117-125.
- Matthys, KE., Bult, H. Nitric oxide function in atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 1997; 6:3-21.
- Mekaj, YH., Daci, FT., Mekaj, AY. New insights into the mechanisms of action of aspirin and its use in the prevention and treatment of arterial and venous thromboembolism. *Ther Clin Risk Manag*. 2015; 11:1449-1456.
- Merhi-Soussi, F. *et al.* Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2005; 66:583-593.
- Miotla, JM., Ridger, VC., Hellewell, PG. Dominant role of L- and P-selectin in mediating CXC chemokine-induced neutrophil migration *in vivo*. *Br J Pharmacol*. 2001; 133:550-556.
- Mischericow, N., Heck, AJR. Targeted large-scale analysis of protein acetylation. *Proteomics*. 2011; 11:571-589.
- Mitsui, T. *et al.* Hypertension and Angiotensin II Hypersensitivity in Aminopeptidase A-deficient Mice. *Mol Med*. 2003; 9(1-2):57-62.
- Moss, JWE., Ramji, DP. Cytokines: Roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med Chem*. 2016; 8(11):1317-1330.
- Moyer, CF. *et al.* Synthesis of IL-1 alpha and IL-1 beta by arterial cells in atherosclerosis. *Am J Pathol*. 1991; 138(4):951-960.
- Mundi, S. *et al.* Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors—a review. *Cardiovasc Res*. 2018; 114(1):35-52.
- Musicki, B. *et al.* Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(33):11870-11875.

Naghavi, M. *et al.* From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient: A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part I. *Circulation*. 2003; 108(14):1664-1672.

Naghavi, M. *et al.* Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015; 385(9963):117-171.

Nakashima, Y. *et al.* ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14:133-140.

Napoli, C. *et al.* Mildly Oxidized Low-Density Lipoprotein Impairs Responses of Carotid but Not Basilar Artery in Rabbits. *Stroke*. 1997; 28(11):2266-2272.

Nelson, RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care*. 2013; 40(1):195-211.

Ngoh, GA. *et al.* O-GlcNAc Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2010; 107(2):171-185.

Ngoh, GA. *et al.* Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids*. 2011; 40(3):895-911.

Nowak, WN. *et al.* Reactive Oxygen Species Generation and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37:e41-e52.

Öhman, MK. *et al.* Visceral adipose tissue inflammation accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2008; 117(6):798-805.

Ohn, T. *et al.* A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat Cell Biol*. 2008; 10:1224-1231.

Okazaki, S. *et al.* Association of interleukin-6 with the progression of carotid atherosclerosis: a 9-year follow-up study. *Stroke*. 2014; 45(10): 2925-2929.

Olson, KR. The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 301:R297-R312.

Ouimet, M., Barrett, TJ., Fisher, EA. HDL and Reverse Cholesterol Transport: Basic Mechanisms and Their Roles in Vascular Health and Disease. *Circ Res*. 2019; 124(10):1505-1518.

Papadopoulou, C. *et al*. The role of the chemokines MCP-1, GRO-alpha, IL-8 and their receptors in the adhesion of monocytic cells to human atherosclerotic plaques. *Cytokine*. 2008; 43(2):181-186.

Park, YM. *et al*. Oxidized LDL/CD36 interaction induces loss of cell polarity and inhibits macrophage locomotion. *Mol Biol Cell*. 2012; 23:3057-3068.

Park, YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med*. 2014; 46:e99.

Patel, J., Channon, KM., McNeill, E. The Downstream Regulation of Chemokine Receptor Signalling: Implications for Atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:459520.

Pedersen, EM. *et al*. Distribution of Early Atherosclerotic Lesions in the Human Abdominal Aorta Correlates with Wall Shear Stresses Measured *In Vivo*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999; 18:328-333.

Poljak, K. *et al*. Analysis of substrate specificity of *Trypanosoma brucei* oligosaccharyltransferases (OSTs) by functional expression of domain-swapped chimeras in yeast. *J Biol Chem*. 2017; 292(49):20342-20352.

Poljak, K. *et al*. Quantitative Profiling of N-linked Glycosylation Machinery in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*. 2018; 17(1):18-30.

Qazi, BS., Tang, K., Qazi, A. Recent Advances in Underlying Pathologies Provide Insight into Interleukin-8 Expression-Mediated Inflammation and Angiogenesis. *Int J Inflam.* 2011; 2011:908468.

Quinn, MT. *et al.* Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(9): 2995-2998.

Quinn, MT., Parthasarathy, S., Steinberg, D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(8): 2805-2809.

Rafieian-Kopaei, M. *et al.* Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *Int J Prev Med.* 2014; 5(8):927-946.

Raman, KG. *et al.* Early Hypercholesterolemia Contributes to Vasomotor Dysfunction and Injury Associated Atherogenesis that can be Inhibited by Nitric Oxide. *J Vasc Surg.* 2011; 53(3):754-763.

Ramji, DP., Davies, TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26:673-685.

Rammos, G., Peppes, V., Zakopoulos, N. Transient Insulin Resistance in Normal Subjects: Acute Hyperglycemia Inhibits Endothelial-Dependent Vasodilatation in Normal Subjects. *Met Syndr Relat Disord.* 2008; 6(3):159-170.

Rayner, KJ. Cell Death in the Vessel Wall: The Good, the Bad, the Ugly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37(7):e75-e81.

Ree, R., Varland, S., Arnesen, T. Spotlight on protein N-terminal acetylation. *Exp Mol Med.* 2018; 50:90.

Reissig, JL. Phosphoacetylglucosamine mutase of *Neurospora*. *J Biol Chem.* 1956; 219(2):753-767.

Ricciotti, E., FitzGerald, GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(5):986-1000.

Rider, P. *et al.* IL-1 α and IL-1 β Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. *J Immunol.* 2011; 187(9): 4835-4843.

Rogers, LD., Overall, CM. Proteolytic Post-translational Modification of Proteins: Proteomic Tools and Methodology. *Mol Cell Proteomics.* 2013; 12(12):3532-3542.

Romano, M. *et al.* Role of IL-6 and Its Soluble Receptor in Induction of Chemokines and Leukocyte Recruitment. *Immunity.* 1997; 6(3):315-325.

Rong, JX. *et al.* Arterial Injury by Cholesterol Oxidation Products Causes Endothelial Dysfunction and Arterial Wall Cholesterol Accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:1885-1894.

Roos, MD. *et al.* O Glycosylation of an Sp1-Derived Peptide Blocks Known Sp1 Protein Interactions. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(11):6472:6480.

Rosenson, RS. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis.* 2004; 173:1-12.

Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993; 362:801-809.

Ross, R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115-126.

Ross, S. *et al.* Effect of Bile Acid Sequestrants on the Risk of Cardiovascular Events: A Mendelian Randomization Analysis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015; 8(4):618-627.

Roth, GA. *et al.* Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70(1):1-25.

Rubbo, H., Batthyany, C., Radi, R. Nitric Oxide - Oxygen Radicals Interactions in Atherosclerosis. *Biol Res.* 2000; 33(2):167-175.

Rudijanto, A. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells on The Pathogenesis of Atherosclerosis. *Acta Med Indones.* 2007; 39(2):86-93.

Ruparelia, N., Digby, JE., Choudhury, RP. Effects of niacin on atherosclerosis and vascular function. *Curr Opin Cardiol.* 2011; 26(1):66-70.

Santoyo-Ramos, P., Castañeda-Patlán, MC., Robles-Flores, M. The Role of O-Linked β -N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Modification in Cell Signaling. In: Petrescu, S. *Glycosylation*. Rijeka, Croácia: InTech, 2012, cap. 13, 287-300.

Sanz, J., Fayad, ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature.* 2008; 451: 953-957.

Sayat, R. *et al.* O-GlcNAc-glycosylation of β -catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res.* 2008; 314(15):2774-2787.

Schiffrin, EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2005; 43:19-29.

Scholz, CC. *et al.* Regulation of IL-1 β -induced NF- κ B by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(46):18490-18495.

Schürmann, C. *et al.* The NADPH oxidase Nox4 has anti-atherosclerotic functions. *Eur Heart J.* 2015; 36(48):3447-3456.

Seimon, T., Tabas, I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2009:S382-S387.

Sentman, ML. *et al.* Extracellular Superoxide Dismutase Deficiency and Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:1477-1482.

Shafi, R. *et al.* The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(11): 5735-5739.

Sheehan, AL. *et al.* Role for Nox1 NADPH Oxidase in Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2011; 216(2):321-326.

Shrimal, S., Gilmore, R. Glycosylation of closely spaced acceptor sites in human glycoproteins. *J Cell Sci.* 2013; 126(23):5513-5523.

Silva, JF. *et al.* Acute Increase in O-GlcNAc Improves Survival in Mice With LPS-Induced Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Front Physiol.* 2019; 10:1614.

Silverman, ME. William Harvey and the discovery of the circulation of blood. *Clin Cardiol.* 1985; 8:244-246.

Sirker, A., Zhang, M., Shah, AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol.* 2011; 106:735-747.

Sitia, S. *et al.* From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010; 9:830-834.

Slawson, C. *et al.* A Mitotic GlcNAcylation/Phosphorylation Signaling Complex Alters the Posttranslational State of the Cytoskeletal Protein Vimentin. *Mol Biol Cell.* 2008; 19(10): 4130-4140.

Slijkhuis, W., Mali, W., Appelman, Y. A historical perspective towards a non-invasive treatment for patients with atherosclerosis. *Neth Heart J.* 2009; 17(4):140-144.

Smith, WB. *et al.* Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology.* 1991; 72:65-72.

Soliman, GA. Dietary Cholesterol and the Lack of Evidence in Cardiovascular Disease. *Nutrients.* 2018; 10:780.

Song, L., Luo, ZQ. Post-translational regulation of ubiquitin signaling. *J Cell Biol.* 2019; 218(6):1776-1786.

Song, P. *et al.* Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Lancet.* 2020; 8(5):E721-E729.

Souza-Silva, L. *et al.* Glycosylation with O-linked β -N-acetylglucosamine induces vascular dysfunction via production of superoxide anion/reactive oxygen species. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018; 96(3):232-240.

Spagnoli, LG. *et al.* Extracranial thrombotically active carotid plaque as a risk factor for ischemic stroke. *JAMA.* 2004; 292(15):1845-1852.

Spiro, RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 2002; 12(4):43R-56R.

Sprung, R. *et al.* Identification and Validation of Eukaryotic Aspartate and Glutamate Methylation in Proteins. *J Proteome Res.* 2008; 7(3):1001-1006.

Staels, B. *et al.* Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation.* 1998; 98(19):2088-2093.

Stancu, C., Sima, A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med.* 2001; 5(4):378-387.

Stary, HC. *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995; 92(5):1355-1374.

Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem,* 1997; 272(34):20963-20966.

Steiner, G. Fibrates and coronary risk reduction. *Atherosclerosis*. 2005; 182:199-207.

Sternbach, GL. *et al.* Galen and the origins of artificial ventilation, the arteries and the pulse. *Resuscitation*. 2001; 49:119-122.

Su, J. *et al.* oxLDL antibody inhibits MCP-1 release in monocytes/macrophages by regulating $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ channel flow. *J Cell Mol Med*. 2017; 21(5):929-940.

Suzuki, H. *et al.* In Vivo Evidence for Microvascular Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 1995; 25(5):1083-1089.

Takei, A., Huang, Y., Lopes-Virella, MF. Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. *Atherosclerosis*. 2001; 154(1):79-86.

Tang, WHW., Hazen, SL. Advances in new therapeutic targets for atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2017; 14(2):71-72.

Tavintharan, S., Kashyap, ML. The Benefits of Niacin in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2001; 3:74-82.

Turner, JY., Clark, G. Alkylation of amines: a study of methylation and its effects on amines. *J Histochem Cytochem*. 1960; 8:184-188.

Thompson, RC. *et al.* Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations. *Lancet*. 2013; 381(9873):1211-1222.

Tie, C. *et al.* Ezetimibe Attenuates Atherosclerosis Associated with Lipid Reduction and Inflammation Inhibition. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0142430.

Topper, JN. *et al.* Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:10417-10422.

Torres, CR., Hart, GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes: Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* 1984; 259(5):3308-3317.

Totter, JR., Medina, VJ., Scoseria, JL. Luminescence during the oxidation of hypoxanthine by xanthine oxidase in the presence of dimethylbiacridylum nitrate. *J Biol Chem.* 1960a; 235(1):238-241.

Totter, JR., De Dugros, EC., Riveiro, C. The use of chemiluminescent compounds as possible indicators of radical production during xanthine oxidase action. *J Biol Chem.* 1960b; 235(6):1839-1842.

Tousoulis, D., Charakida, M., Stefanadis, C. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Heart.* 2006; 92:441-444.

Touyz, RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol.* 2005; 90(4):449-455.

Uauy, R., Castillo, C. Lipid Requirements of Infants: Implications for Nutrient Composition of Fortified Complementary Foods. *J Nutr.* 2003; 133(9):2962S-2972S.

Uyemura, K. *et al.* Cross-regulatory Roles of Interleukin (IL)-12 and IL-10 in Atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1996; 97(9):2130-2138.

Vacek, TP. *et al.* Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. *Vasc Health Risk Manag.* 2015; 11:173-183.

van Haren, MJ. *et al.* Transition state mimics are valuable mechanistic probes for structural studies with the arginine methyltransferase CARM1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(14):3625-3630.

van Staalduinen, LM., Jia, Z. Post-translational hydroxylation by 2OG/Fe(II)-dependent oxygenases as a novel regulatory mechanism in bacteria. *Front Microbiol.* 2014; 5:798.

Vancraeynest, D. *et al.* Imaging the Vulnerable Plaque. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 57(20):1961-1979.

VanderLaan, PA., Reardon, CA., Getz, GS. Site Specificity of Atherosclerosis: Site-Selective Responses to Atherosclerotic Modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:12-22.

Vaziri, ND. Role of dyslipidemia in impairment of energy metabolism, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2013; 18:265-268.

Vendrov, AE. *et al.* Attenuated Superoxide Dismutase 2 Activity Induces Atherosclerotic Plaque Instability During Aging in Hyperlipidemic Mice. *J Am Heart Assoc.* 2017; 6(11):e006775.

Violi, F. *et al.* NADPH Oxidase-2 and Atherothrombosis: Insight From Chronic Granulomatous Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37(2):218-225.

Vogiatzis, G., Tousoulis, D., Stefanadis, C. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol.* 2009; 50:402-409.

Vukovic, I. *et al.* The origin and differentiation potential of smooth muscle cells in coronary atherosclerosis. *Exp Clin Cardiol* 2006; 11(2):123-128.

Wang, Y. *et al.* Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018; 217(6):1915-1928.

Watts, GF., Dimmitt, SB. Fibrates, dyslipoproteinaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 1999; 10:561-574.

Weber, C., Noels, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine.* 2011; 17(11):1410-1422.

Webster, DM. *et al.* O-GlcNAc modifications regulate cell survival and epiboly during zebrafish development. *BMC Dev Biol.* 2009; 9:28.

Wells, L., Whelan, SA., Hart, GW. O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 302(3):435-441.

Wilkinson, KA., Henley, JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J.* 2010; 428(2):133-145.

Wolak, T. Osteopontin – A multi-modal marker and mediator in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis.* 2014; 236:327-337.

Xing, D. *et al.* Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endoluminal arterial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295(1):H335-H342.

Xing, D. *et al.* O-GlcNAc Modification of NF κ B p65 Inhibits TNF- α -Induced Inflammatory Mediator Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *PLoS One.* 2011; 6(8):e24021.

Xu, S. *et al.* Nox4 NADPH oxidase contributes to smooth muscle cell phenotypes associated with unstable atherosclerotic plaques. *Redox Biol.* 2014; 2:642-650.

Yakovlev, VA., Mikkelsen, RB. Protein tyrosine nitration in cellular signal transduction pathways. *J Recept Signal Transduct Res.* 2010; 30(6):420-429.

Yang, X., Zhang, F., Kudlow, JE. Recruitment of O-GlcNAc Transferase to Promoters by Corepressor mSin3A: Coupling Protein O-GlcNAcylation to Transcriptional Repression. *Cell.* 2002; 110(1):69-80.

Yang, H. *et al.* Retardation of Atherosclerosis by Overexpression of Catalase or Both Cu/Zn-Superoxide Dismutase and Catalase in Mice Lacking Apolipoprotein E. *Circ Res.* 2004; 95:1075-1081.

Yang, XJ., Seto, E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*. 2008a; 31(4):449-461.

Yang, X. *et al*. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*. 2008b; 451:964-969.

Yang, X. *et al*. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front Physiol*. 2017; 8:600.

Yurdagul, A Jr. *et al*. Oxidized LDL Induces FAK-Dependent RSK Signaling to Drive NF- κ B Activation and VCAM-1 Expression. *J Cell Sci*. 2016; 129(8):1580-1591.

Zeiffer, U. *et al*. Neointimal Smooth Muscle Cells Display a Proinflammatory Phenotype Resulting in Increased Leukocyte Recruitment Mediated by P-Selectin and Chemokines. *Circ Res*. 2004; 94:776-784.

Zernecke, A., Weber, C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2010; 86(2):192-201.

Zettler, ME. *et al*. OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284:H644-H653.

Zhang, F. *et al*. O-GlcNAc Modification Is an Endogenous Inhibitor of the Proteasome. *Cell*. 2003. 115(6):715-725.

Zhang, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2008; 103:398-406.

Zhang, Z. *et al*. O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014; 5:206.

Zhang, D. *et al*. OGT-mediated O-GlcNAcylation promotes NF- κ B activation and inflammation in acute pancreatitis. *Inflamm Res*. 2015; 64(12):943-952.

Zhu, W., Leber, B., Andrews, DW. Cytoplasmic *O*-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. EMBO J. 2001; 20(21):5999-6007.

Zurlo, G. New Insights into Protein Hydroxylation and Its Important Role in Human Diseases. Biochem Biophys Acta. 2016; 1866(2):208-220.

Anexos

11. Anexos

11.1 Certificado da CEUA-FMRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*O papel da O-glicosilação por N-acetil-glucosamina no fenótipo da placa aterosclerótica*”, registrado com o número **229/2017**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de abril de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 62 camundongos ApoE KO machos pesando 30g oriundos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/04/2019 a 31/12/2019.

We certify that the Protocol *n° 229/2017*, entitled “*The role of O-GlcNAcylation in the atherosclerotic plaque phenotype*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *04/29/2019*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 62 male ApoE KO mice weighing 30g from the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 12/31/2019.

Ribeirão Preto, 29 de abril de 2019

Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP – USP